

**ÉTUDE DES MÉCANISMES MOLÉCULAIRES PERMETTANT À DLK DE
RÉGULER LA NEURITOGÉNÈSE**

par

Guillaume St-Cyr

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, mars 2020

Le 27 mars 2020

*le jury a accepté le mémoire de Monsieur Guillaume St-Cyr
dans sa version finale*

Membres du jury

Professeur Richard Blouin
Directeur de Recherche
Département de biologie

Professeur Nicolas Gévry
Évaluateur interne
Département de biologie

Professeur Viktor Steimle
Président rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

Les rôles de DLK ('dual leucine zipper kinase') dans le système nerveux sont relativement bien décrits dans la littérature. Elle est, entre autres, impliquée dans la formation et la croissance des neurites. Cette propriété que possède DLK est attribuable, au moins en partie, à son effet sur le cytosquelette. Plusieurs protéines associées aux microtubules telles que DCX, Map1b et Map2 participent à l'assemblage des microtubules, l'élongation des neurites et sont parmi les effecteurs de l'axe signalisation qui médient la réorganisation cytosquelettique. Cependant, il existe plusieurs autres effecteurs de DLK et certains d'entre eux restent à être identifiés. Considérant l'importance de la régulation du cytosquelette dans la neuritogenèse et l'implication de DLK dans ce processus, on supposait que la recherche de ces effecteurs révélerait des protéines fonctionnellement associées au cytosquelette ou en faisant partie. Nous désirions, donc, durant mon projet de maîtrise, contribuer à l'identification de ces effecteurs et caractériser le rôle particulier d'un de ces effecteurs dans la neuritogenèse. L'analyse comparative du phosphoprotéome des cellules Neuro-2a déplétées de DLK a révélé plusieurs peptides différenciellement phosphorylés dont deux phosphopeptides et, ainsi, deux sites de phosphorylation de la nestine (S1837, S894) étant significativement moins phosphorylés lorsque DLK est déplété. La génération de mutants et la quantification de leur expression ont permis d'observer la diminution de la stabilité de la nestine S894D/S1837D. De plus, la transfection du mutant S894A/S1837A a inhibé la croissance des neurites, ce qui suggère que la réduction de la stabilité de la nestine est nécessaire à la neuritogenèse. Elle est également fortement induite par la déplétion de la nestine. Ces observations suggèrent que DLK favorise la neuritogenèse en inhibant la nestine grâce à la régulation de sa phosphorylation aux résidus sérines 894 et 1837.

Mots-clés : DLK, nestine, neuritogenèse, cytosquelette, signalisation cellulaire, phosphoprotéomique

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Pr. Richard Blouin. Je n'aurais pas su comment espérer avoir un meilleur directeur de recherche. J'aimerais également remercier mes conseillers Pr. Viktor Steimle et Pr. Nicolas Gévry. J'ai grandement apprécié leur implication durant ma maîtrise. Mes nombreux collègues méritent aussi mes remerciements, particulièrement Shirley Caron qui m'a accompagné durant ma maîtrise et Martin Morin et Stéphanie Bianco qui m'ont grandement aidé à réaliser plusieurs expériences. Il importe de remercier l'Université de Sherbrooke et le CRSNG pour le financement de mon projet.

TABLES DES MATIÈRES

SOMMAIRE	iv
REMERCIEMENTS	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	viii
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES TABLEAUX	xii
CHAPITRE 1 – INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 Introduction à la neurogenèse	1
1.2 Niches neurogéniques adultes	2
1.3 Étapes générales de la neurogenèse adulte	5
1.4 Rôles et régulation du cytosquelette durant la neuritogenèse	8
1.5 Dual leucine zipper kinase (DLK, MAP3K12)	14
1.5.1 Voies de signalisation régulées par DLK et impliquées dans la croissance des neurites	16
1.5.2 Mécanismes moléculaires régulant DLK	18
1.5.3 Rôles de DLK dans le système nerveux	21
1.6 Hypothèse et objectifs	23
CHAPITRE 2 – Article	25
2.1 Une analyse quantitative du phosphoprotéome identifie la nestine comme un médiateur potentiel des effets de la voie de signalisation DLK sur la croissance des neurites	25
2.1.1 Présentation de l'article	25
2.1.2 Page de présentation du manuscrit	27
2.1.3 Abstract	28
2.1.4 Introduction	28
2.1.5 Results	31
2.1.6 Discussion	46

2.1.7 Materials and methods	51
2.1.8 References	56
2.1.9 Informations supplémentaires article	63
CHAPITRE 3 – DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE	67
BIBLIOGRAPHIE	74

LISTE DES ABRÉVIATIONS

actine F	actine filamenteuse
AD	"Alzheimer disease"
ALS	sclérose latérale amyotrophique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
APC	"adenomatous polyposis coli"
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATF-2	"activating transcription factor 2"
CAM	"cell adhesion molecule"
CD	"cluster of differentiation"
CDK5	"cyclin-dependent kinase 5"
Clasps	protéines associées aux CLIP
CLIP	"cytoplasmic linker protein"
CNS	"central nervous system"
CRMP-2	collapsine 2
CSF	liquide cérébro-spinal
DCX	doublecortine
DLK	"dual leucine zipper kinase"
DRG	"dorsal root ganglion"
EB	"end-binding protein"
ECM	"extracellular matrix"
EDTA	"Ethylenediaminetetraacetic acid"
EGFP	"enhanced green fluorescent protein"
ENA	facteur de polymérisation de l'actine F enabled
ERK	"extracellular signal-regulated kinase"
ERM	Ezrine – Radixine – Moésine

FMRP	"fragile X mental retardation protein"
FXS	"fragile X syndrome"
GAP-43	"growth-associated protein 43 kDa"
GNDF	"glia cell line-derived neurotrophic factor"
GTP	guanosine triphosphate
IF	"intermediate filament"
IPCs	cellules progénitrices intermédiaires
JIP-1	"JNK-interacting protein 1"
JNK	kinase N-terminale de c-Jun
KIF	superfamille des kinésines
LIMK	kinase du domaine LIM
MAP	protéines associées aux microtubules
MAPK	"mitogen-activated protein kinase"
Marcksl1	"myristoylated alanine-rich C-kinase substrate' (Marcks)-like protein 1"
MKK	MAPK kinase
MLK	"mixed-lineage kinase"
MS	"mass spectrometry"
MTs	microtubules
Ncam1	"Neural cell adhesion molecule 1"
Neo	"neomycin"
NF-L,-M,-H	neurofilaments -léger, -moyen, -lourd
NSCs	cellules souches neurales
PAGE	"SDS-polyacrylamide gel electrophoresis"
PCR	"polymerase chain reaction"
PNS	"peripheral nervous system"
PRM	"parallel reaction monitoring"
PTM	modifications post-traductionnelles
PVDF	"polyvinylidene difluoride"
RA	"retinoic acid"
RGLs	radial glia-like cells'

ROCK	protéine kinase associée à Rho
RT-qPCR	"reverse transcriptase quantitative PCR"
SCLIP	protéine similaire à SCG10
SEM	"standard error of mean"
Sema	semaphorine
SGZ	zone sous-granulaire
shRNA	"short hairpin RNA"
SVZ	zone sous-ventriculaire
TBS	"Tris-buffered saline"
TBS-T	"TBS Tween-20"
TTL	ligase de tyrosine à la tubuline
VASP	phosphoprotéine stimulée par les vasodilatateurs
Wnd	Wallenda
wt	"wild type"

LISTE DES FIGURES

Figure 1	Schématisation d'une coupe sagittale d'un cerveau de rat et localisation des niches neurogéniques	2
Figure 2	Schématisation de la SVZ	4
Figure 3	Schématisation de la SGZ	5
Figure 4	Étapes générales de la neurogenèse adulte	7
Figure 5	La neuritogenèse	9
Figure 6	Polymérisation dynamique des microtubules	11
Figure 7	Localisation de DLK	15
Figure 8	Axe de signalisation DLK – JNK	17
Figure 9	Régulation du cytosquelette lors de la neuritogenèse par l'axe de signalisation DLK – JNK	18
Figure 10	Mécanismes moléculaires régulant l'activité de DLK	20
Figure 11	Les souris DLK ^{-/-} présentent une fasciculation axonale défectueuse	23
Figure 12	Knockdown of DLK in Neuro-2a cells	33
Figure 13	Quantitative phosphoproteomics analysis of Neuro-2a cells after DLK depletion	35
Figure 14	DLK depletion reduces the phosphorylation level of Ser-894 and Ser-1837 on nestin	39
Figure 15	Phosphorylation of nestin at Ser-894 and Ser-1837 decreases its stability	42
Figure 16	Expression of phosphodeficient S894A/S1837A nestin mutant impairs neurite outgrowth	44
Figure 17	Depletion of nestin promotes neurite formation	45
Figure 18	Original images of the western blot data shown in Fig. 12a	64
Figure 19	Original images of the western blot data shown in Fig. 15a	65

LISTE DES TABLEAUX

Table 1	Proteins with decreased (red) or increased (green) phosphorylation by 1.5-fold or more	36
Table 2	List of primers used for real time quantitative PCR	66
Table 3	List of primers used for mutagenesis of nestin	66

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Introduction à la neurogenèse

Le processus par lequel une cellule progénitrice neurale se différencie en neurone définit la neurogenèse. Ce mécanisme supporte le développement du système nerveux et, bien qu'on en ait longtemps cru autrement, nous savons maintenant, malgré quelques incertitudes (Sorrells et al., 2018), que la neurogenèse persiste lors de la vie adulte. Ce changement de philosophie a été facilité, entre autres, par la démonstration de l'intégration fonctionnelle de nouveaux neurones dans le système nerveux central du canari mature (Paton et Nottebohm, 1984), l'isolation de cellules souches neurales multipotentes à partir de cerveaux de souris (Richards et al., 1992; Reynolds et Weiss, 1992) et la visualisation de neurones générés durant la vie adulte humaine (Eriksson et al., 1998). La mise en évidence de la neurogenèse adulte expose la capacité, quoique très limitée, du système nerveux central à se régénérer. Ainsi, il devient possible d'imaginer, par exemple, que cette faculté puisse être cultivée pour compenser les pertes caractéristiques ou les anomalies neuronales observées chez les patients atteints de maladies neurodégénératives, de troubles cognitifs ou neuropsychiatriques et ayant subi des blessures quelconques.

1.2 Niches neurogéniques adultes

Durant la vie adulte, en conditions normales, la neurogenèse se concentre à la zone sous-ventriculaire (SVZ) et la zone sous-granulaire (SGZ) du gyrus denté de l'hippocampe (Figure 1) (Doetsch et al., 1999; Kuhn et al., 1996).

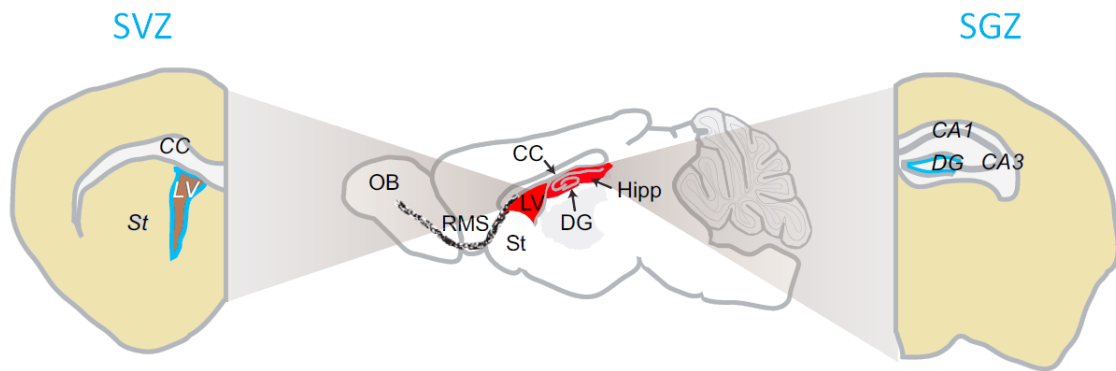


Figure 1. Schématisation d'une coupe sagittale d'un cerveau de rat et localisation des niches neurogéniques (adaptée de Bond et al., 2015). SVZ, zone sous-ventriculaire; SGZ, zone sous-granulaire; CC, corps calleux; LV, ventricule latéral; DG, gyrus denté; Hipp, Hippocampe; St, striatum; RMS, canal migratoire rostral; OB, bulbe olfactif; CA1/CA3, régions de l'hippocampe.

La zone sous-ventriculaire est séparée du liquide cérébro-spinal (CSF) des ventricules latéraux par une couche pseudostratifiée de cellules épendymaires multi- ou bi-ciliées. Elles sont organisées en moulin à vent centré sur les projections apicales des ‘radial glia-like cells’ (NSCs) autrement appelées les cellules de type B. Les projections basales s’étendent dans le CSF et les projections apicales rejoignent les vaisseaux sanguins (Mirzadeh et al., 2008). De cette façon, les NSCs sont en mesure d’intégrer les stimuli environnementaux et d’y réagir adéquatement. Les NSCs se différencieront en cellules de type C (‘Transient amplifying cells’, cellules progénitrices intermédiaires) avant de donner lieu aux cellules de type A (Neuroblastes). Les neuroblastes migrent hors de la zone sous-ventriculaire par le canal migratoire rostral, un canal formé d’astrocytes spécialisés, pour atteindre le bulbe olfactif et se différencier en interneurones (Figure 2) (Lledo et al., 2006).

La zone sous-granulaire du gyrus denté de l’hippocampe est comprise entre une couche de cellules granuleuses et le hilus du gyrus denté. Elle contient le corps cellulaire des cellules gliales radiales (‘radial glia-like cells’, RGLs), les cellules de type 1 qui agissent à titre de NSCs. Leurs projections s’étendent pour interagir avec les vaisseaux sanguins à proximité et pour rejoindre la couche moléculaire interne composée d’axones et de synapses. Ces interactions avec les constituants de la niche neurogénique jouent un grand rôle dans la régulation de la neurogenèse. Les cellules de type 1 se différencient successivement en deux types de progéniteurs intermédiaires (cellules de type 2a et 2b), neuroblastes et cellules granuleuses. Les neuroblastes migrent tangentiellement à travers la SGZ et radialement dans la couche de cellules granuleuses en terminant leur maturation et intégration au tissu existant (Figure 3) (Fuentesalba et al., 2012).

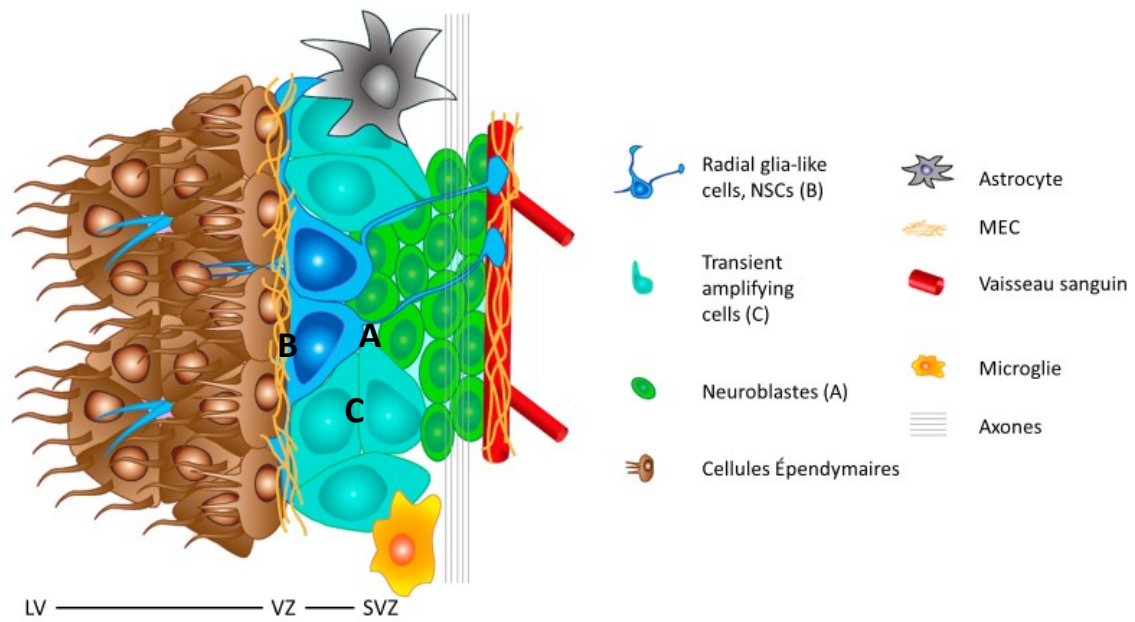


Figure 2. Schématisation de la SVZ (adaptée de Bond et al., 2015). LV, ventricule latéral; VZ, zone ventriculaire; SVZ, zone sous-ventriculaire; MEC, matrice extra-cellulaire. Les ‘radial glia-like cells’ sont également appelées les cellules de type B tandis que les ‘transient amplifying cells’ sont appelées les cellules de type C et les cellules de type A représentent les neuroblastes.

cellulaire et favorisent la conservation du phénotype et l'ancrage des cellules à la niche neurogénique (Mira et al., 2010; Chavali et al., 2018). Les cellules progénitrices intermédiaires (IPCs) caractérisent un état prolifératif qui permet l'amplification du nombre de cellules neurales produites et la progression de celles-ci dans une voie de différenciation particulière. À ce stade, dans la SGZ, les cellules de type 2 sont en mesure de réagir aux stimuli synaptiques et commencent à exprimer des marqueurs de lignées neuronales (Kempermann et al., 2015). Lorsque celles-ci s'engagent dans la voie de différenciation neuronale, elles produisent les neuroblastes qui échapperont au cycle cellulaire et deviendront 'post-mitotique', c'est-à-dire que, à partir de ce moment, ils ne se diviseront plus. La régulation du cycle cellulaire joue un grand rôle dans la neurogenèse et plusieurs éléments associés à cette régulation sont essentiels au développement des neurones (Farioli-Vecchioli et Tirone, 2015). La différenciation des neuroblastes s'accompagne également de la formation de neurites, les précurseurs des dendrites et des axones. Ces changements morphologiques confèrent aux neurones immatures une polarité qui les définit (Takano et al., 2015). Ils profitent de ce remodelage du cytosquelette pour migrer tangentiellement vers leur destination. Cette migration transporte les neuroblastes de la SVZ jusqu'au bulbe olfactif et disperse les neuroblastes de la SGZ à travers celle-ci. Un autre événement de migration permet aux neurones immatures d'infiltrer les couches de cellules granuleuses et périglomérulaires du bulbe olfactif et la couche de cellules granuleuses du gyrus denté de l'hippocampe (Zhao et al., 2008). Afin de compléter le développement des neurones immatures et obtenir des interneurons, dans le bulbe olfactif, et des cellules granuleuses, dans le gyrus denté, les neurones doivent s'intégrer au circuit de synapses existant. Cette période est caractérisée par une hyperexcitabilité et une plasticité synaptique accrue. Les neurones qui ne répondent pas adéquatement aux divers stimuli entreront en apoptose (Figure 4) (Ming et Song, 2011). Ce mémoire examinera les mécanismes moléculaires qui soutiennent la formation des neurites et la croissance axonale.

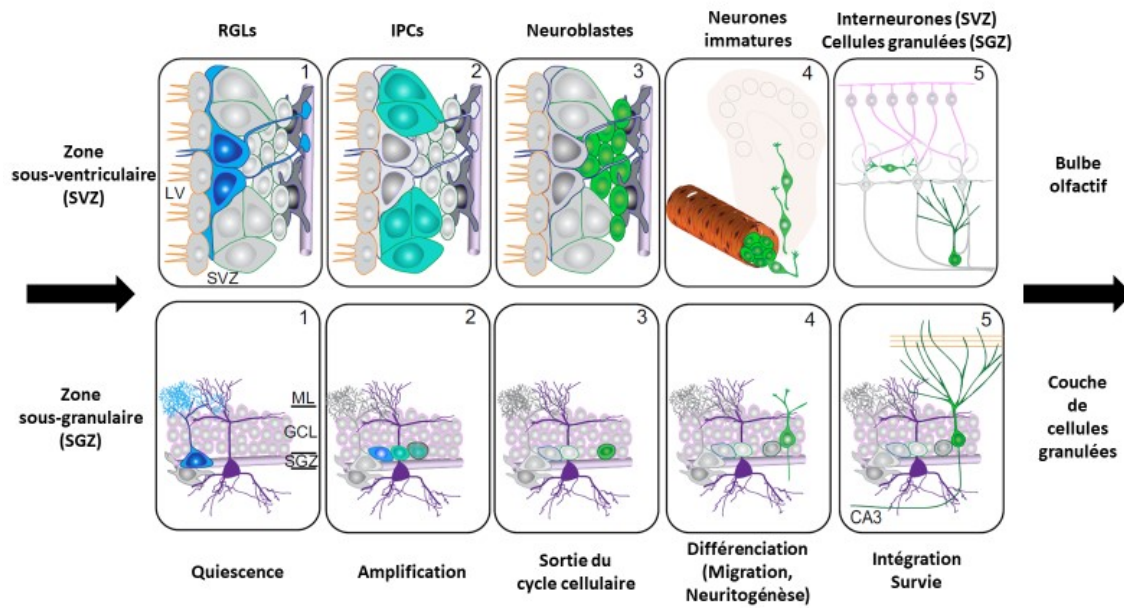


Figure 4. Étapes générales de la neurogenèse adulte (adaptée de Ming et Song, 2011). Types cellulaires (haut) associés aux étapes 1 à 5 (bas) qui guident les neurones en formation de leur niche jusqu'à leur destination finale. La région CA3 de l'hippocampe reçoit les projections des cellules granuleuses nouvellement intégrées. SVZ, zone sous-ventriculaire; SGZ, zone sous-granulaire; LV, ventricule latéral; ML, couche moléculaire; GCL, couche de cellules granuleuses; RGLs, 'radial glia-like cells'; IPCs, 'intermediate progenitor cells'.

1.4 Rôles et régulation du cytosquelette durant la neuritogenèse

La neuritogenèse débute immédiatement après l'entrée de la cellule dans la voie de différenciation neuronale. Elle est initiée par l'activation de récepteurs membranaires en réponse à des signaux extracellulaires qui entraînent principalement la déstabilisation du cytosquelette d'actine et de tubuline. Cette réorganisation du cytosquelette mène au bourgeonnement et à la formation du neurite. La nouvelle structure est, ensuite, stabilisée afin de procéder à son élongation (Figure 5A) (Da Silva et Dotti, 2002). Ce processus se produit à plusieurs endroits autour de la cellule, mais un neurite particulier est préférentiellement synthétisé afin de produire l'axone. La formation du neurite est guidée par le cône de croissance. Il est formé, entre autres, de deux structures motrices hautement dynamiques d'actine : les lamellipodes et les filopodes (Figure 5B). Les lamellipodes sont des protrusions cellulaires minces formées d'un réseau d'actine filamenteuse ramifiée (Iwasa et Mullins, 2007; Small et al., 2002). Les filopodes, quant à eux, sont des extensions des lamellipodes riches en actine filamenteuse organisée en faisceaux (Mattila et Lappalainen, 2008; Lowery et Van Vactor, 2009).

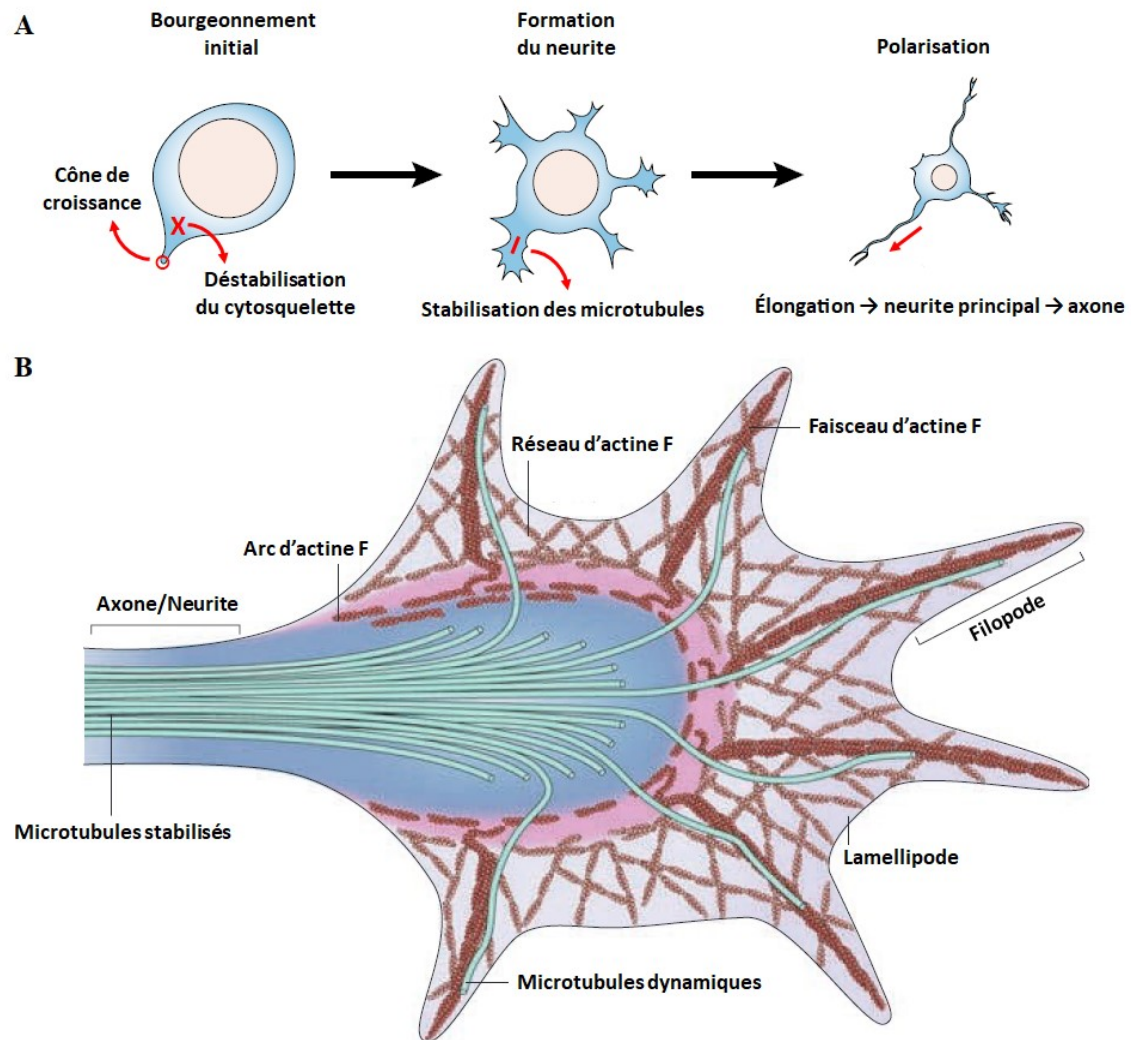


Figure 5. La neuritogenèse. [A] Étapes de la neuritogenèse (adaptée de Da Silva et Dotti, 2002). [B] Structure du cône de croissance (adaptée de Lowery et Van Vactor, 2009).

Ledit guidage et, par le fait même, le mouvement du neurite sont régulés par les GTPases Rho, RhoA, RAC1 et CDC42. Elles agissent sur la dynamique des filaments d'actine en affectant leur assemblage. L'activation de RAC1 stimule la polymérisation de l'actine F en contrôlant les formines, un groupe de protéines impliquées dans la polymérisation de l'actine, le facteur de polymérisation de l'actine F enabled (ENA), la phosphoprotéine stimulée par les vasodilatateurs (VASP) (ENA/VASP) et le complexe de la protéine reliée à l'actine Arp2/3. Ce dernier est également sous le contrôle de CDC42. RhoA favorise le désassemblage et le mouvement rétrograde de l'actine F notamment grâce à ROCK, la protéine kinase associée à Rho, et à ses cibles de phosphorylation : MLCK; une kinase de la chaîne légère de la myosine, LIMK; une kinase du domaine LIM et ERM; les protéines Ezrine – Radixine – Moésine. LIMK inhibe le facteur de dépolymérisation de l'actine (ADF/Cofilin) et, ainsi, favorise la croissance axonale (Lowery et Vactor, 2009; Sainath et Gallo, 2015).

Les microtubules (MTs) sont essentiels au mouvement du cône de croissance, dont ils forment la région centrale, et à l'élongation du neurite, dont ils forment le corps. Les microtubules sont constitués d'hétérodimères de tubuline α et β . Lorsque la tubuline- β est associée au GTP, le dimère s'ajoute à l'extrémité positive et, une fois intégré à la structure, le GTP est hydrolysé en GDP. Le GTP confère à l'extrémité positive une stabilité qui permet la polymérisation du microtubule. Lorsque la coiffe de GTP-tubuline est perdue, le microtubule se déstabilise et se dépolymérise rapidement, durant un phénomène appelé une catastrophe (Figure 6) (Flynn, 2013). Un grand nombre de protéines associées aux microtubules (MAPs) régule la dynamique et l'organisation des microtubules. Ces protéines peuvent être classées en cinq sous-catégories : les protéines suivant les extrémités positives (+TIPs), les protéines liant les dimères de tubuline, les protéines motrices des microtubules, les protéines coupant les microtubules et les protéines stabilisant les microtubules. Ces dernières incluent Map1B, Map2 et Tau, des protéines fortement exprimées dans les neurones. Elles régulent l'espacement entre les faisceaux de microtubules et la cinétique d'assemblage à l'extrémité positive. Par exemple, l'absence de Map2 bloque l'extension des neurites alors que l'absence de Tau bloque l'extension des axones.

La doublecortine (DCX) est une autre MAP qui stabilise les microtubules et favorise leur polymérisation (Moore et al., 2004). Elle se retrouve à l'extrémité positive des microtubules.

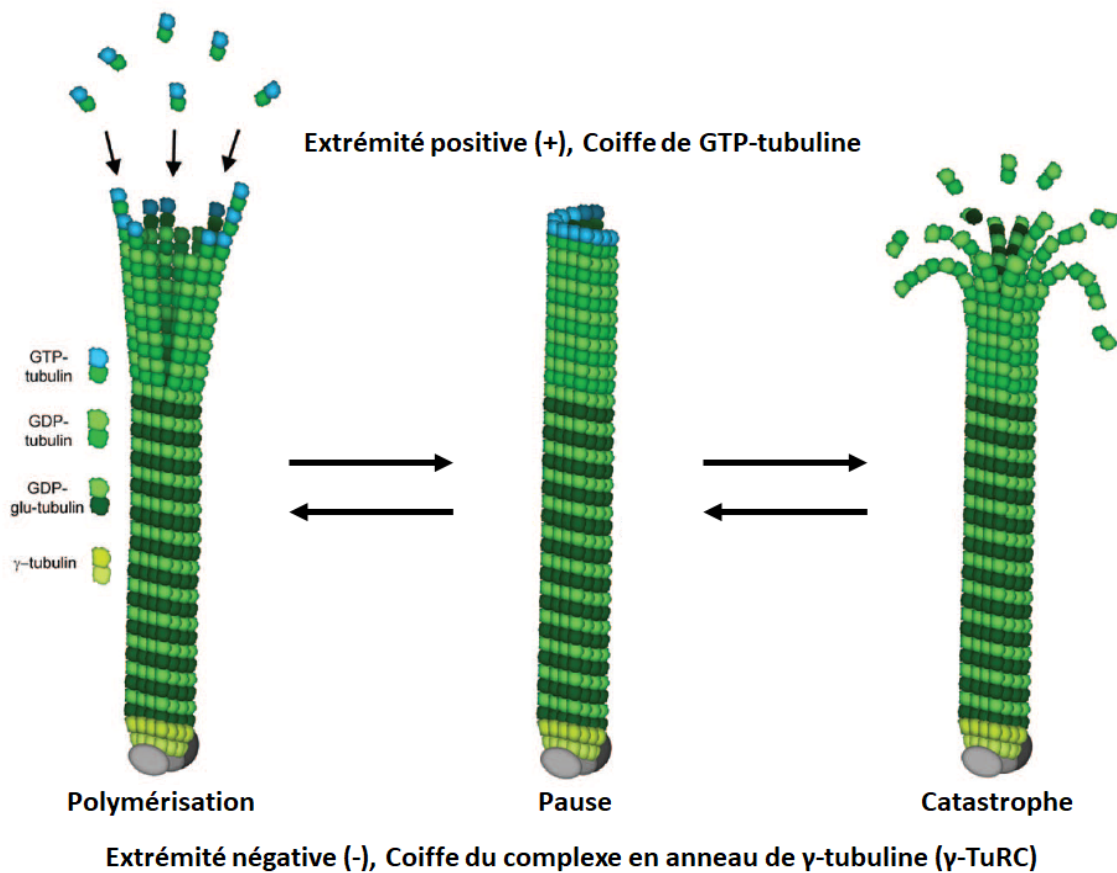


Figure 6. Polymérisation dynamique des microtubules (adaptée de Kevin C Flynn, 2013). La GDP-glu-tubulin est une forme détyrosinée et stabilisée de la tubuline. Le résidu ainsi exposé est un glutamate (Glu).

Les +TIPs regroupent également les protéines liant les extrémités ('end binding proteins', EB1 – 3), les protéines liant le cytoplasme ('cytoplasmic linker proteins', CLIP150/CLIP115), la sous-unité large de dynactine ('dynactin large subunit', p150^{glued}), la protéine APC ('adenomatous polyposis coli') et les protéines associées aux CLIP (Clasps). Elles affectent la dynamique des extrémités positives des microtubules ainsi que la stabilité et l'organisation des microtubules. Elles régulent aussi les interactions des microtubules avec le cytosquelette périphérique d'actine. Les protéines qui lient les dimères de tubuline ont un effet déstabilisant sur les microtubules. La stathmine, SCG10 et la protéine similaire à SCG10 (SCLIP) sont hautement exprimées dans les neurones nouvellement formés. Elles favorisent les catastrophes en séquestrant les dimères de tubulines libres et empêchant la polymérisation des microtubules. La protéine médiatrice de la réponse à la collapsine 2 (CRMP-2), une protéine liant les hétérodimères de tubuline libres, stimule l'assemblage des microtubules en acheminant les dimères aux extrémités positives des protofilaments de tubuline. La régulation de cet élément promeut l'extension des neurites. Les protéines motrices des microtubules ont un rôle établi dans le transport de diverses cargaisons. Elles participent aussi au positionnement, à l'organisation et à la stabilité des microtubules. Il existe plus de quarante-cinq kinésines regroupées dans la superfamille des kinésines (KIF). À titre d'exemple, KIF2A est impliquée dans la dépolymérisation des microtubules et les neurones des souris qui en sont déplétées présentent des défauts de migration, une élongation anormale des axones et une hyper-innervation des cibles des axones sensitifs attribuant, ainsi, à KIF2A un rôle important dans la ramification des axones et l'élagage durant le développement du cerveau (Homma et al., 2003). La kinésine et le complexe dynéine – dynactine, un complexe de protéines motrices longeant les microtubules vers l'extrémité négative, peuvent également lier l'actine et manipuler l'architecture des cônes de croissance. Dans la famille des protéines coupant les microtubules il y a, entre autres, la katanine et la spastine qui coupent les MTs et en génèrent de plus courts qui peuvent être transportés et réorganisés. Ces protéines favorisent la ramification et la croissance des neurites, par exemple, dans les neurones de l'hippocampe (Yu et al., 2008; Chen et al., 2014). Plusieurs types de modifications post-traductionnelles (PTMs) tels que l'acétylation et la phosphorylation affectent l'organisation des microtubules et la liaison des MAPs. Par exemple, la ligase de tyrosine à la tubuline (TTL) catalyse l'addition de tyrosine à l' α -tubuline des

hétérodimères libres de tubuline. Cette modification est nécessaire au guidage du cône de croissance (Marcos et al., 2009). L'expression de DDA3, une protéine associée aux microtubules, augmente l'acétylation et la tyrosination des MTs. Ces PTMs sont généralement retrouvées sur les microtubules stables. DDA3 inhibe la formation et l'élongation des neurites en stabilisant les MTs et facilitant leur empaquetage (Hsieh et al., 2012). En somme, la dynamique du cytosquelette de microtubule et son organisation peuvent être modulées par un grand nombre de PTMs et une panoplie de MAPs nécessaire à la neuritogenèse (Flynn, 2013; Liu et Dwyer, 2014; Lowery et Van Vactor, 2009).

Plusieurs types de filaments intermédiaires sont exprimés dans les neurones. Cependant, leurs rôles dans la neuritogenèse sont peu décrits. L' α -internexine, un filament intermédiaire de type IV, est exprimée dans les neurones qui débutent leur différenciation (Fliegner et al., 1994). Naturellement, son expression, dans le cerveau, est maximale durant le développement embryonnaire et décline après la naissance (Fliegner et al., 1990). Certaines observations suggèrent qu'elle puisse être nécessaire à la croissance axonale. La surexpression de l' α -internexine dans les cellules PC12, une lignée modèle de différenciation neuronale, augmente la croissance des neurites tandis que son inhibition dans les cellules de neuroblastome NB2a/d1 diminue leur élongation. La périphérine, un filament intermédiaire neuronal de type III, est exprimée, chez l'adulte, dans les neurones du système nerveux périphérique et quelques populations de neurones du système nerveux central. Elle participerait à la croissance et au maintien de la stabilité des neurites (Zhao et Liem, 2016). Dans le système nerveux central, les neurofilaments (NF) sont des hétéropolymères composés de quatre sous-unités : le neurofilament léger (NFL), moyen (NFM), lourd (NFH) et l' α -internexine. Ils sont requis pour la croissance radiale des axones et, ainsi, l'augmentation de la vitesse de conduction des axones (Yuan et al., 2012). La nestine ('neuroepithelial stem cell protein') est exprimée, entre autres, dans les cellules souches neurales et, pour cette raison, est utilisée comme marqueur des cellules souches et progénitrices neurales. Cependant, son expression persiste en quantité affaiblie quelques jours dans les neurones immatures. Ce niveau d'expression est suffisant pour médier la sensibilité du cône de croissance axonal à la sémaphorine 3a, une molécule chimio-répulsive

qui inhibe la croissance axonale en induisant la rétraction des filopodes et, ultimement, l'effondrement du cône de croissance (Bernal et Arranz, 2018; Bott et al., 2019). Les changements morphologiques générés lors de la neuritogenèse sous-entendent une réorganisation importante du cytosquelette qui est régulée, entre autres, par la protéine d'intérêt du laboratoire; la 'dual leucine zipper kinase' (DLK).

1.5 Dual leucine zipper kinase (DLK, MAP3K12)

DLK (MAP3K12) est une protéine à activité sérine/thréonine kinase appartenant à un sous-groupe de 'mitogen-activated protein kinase kinase kinase' (MAP3K) connu sous le nom de 'mixed-lineage kinase' (MLK). Les 120 kDa approximatifs qui la définit comprend un domaine catalytique, deux motifs 'leucine-zipper' permettant sa dimérisation et son activation et deux domaines riches en glycine et proline, l'un des deux est également enrichi en sérine (Blouin, 2016). Plusieurs différents tissus tels que la peau, le foie et le pancréas expriment l'ARNm de DLK (Nadeau et al., 1997). Cependant, c'est dans les reins et le cerveau qu'il se retrouve en plus forte quantité (Holzman et al., 1994, Reddy et Pleasure, 1994). Dans l'encéphale en développement, l'expression de DLK est associée aux neurones immatures. Ceux-ci présentent une colocalisation de DLK avec les microtubules et l'appareil de Golgi (Figure 7) (Hirai et al., 2002).

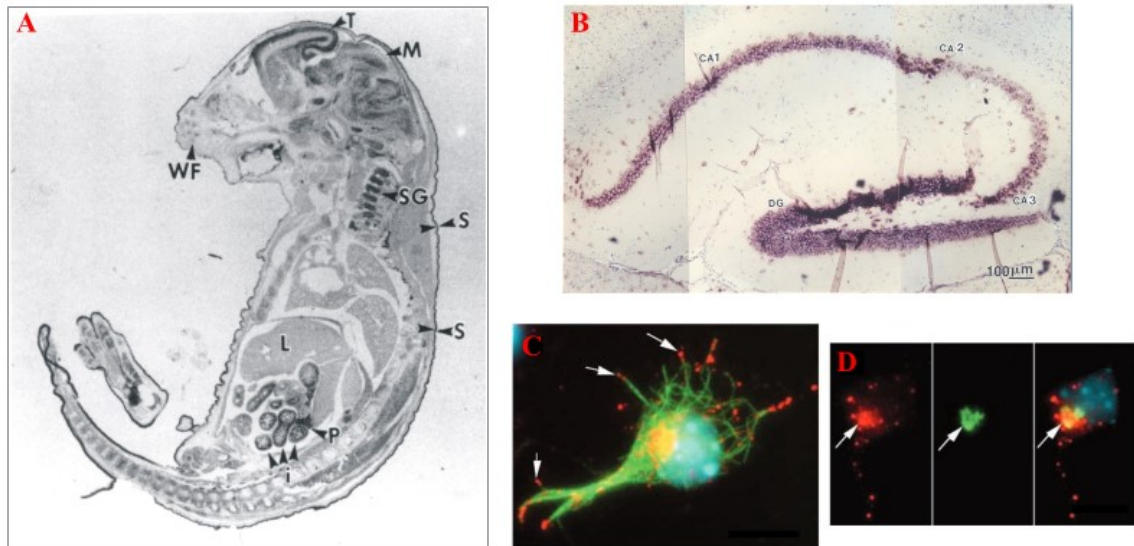


Figure 7. Localisation de DLK. [A] L'expression génique de DLK (noir) durant l'embryogénèse murine est, entre autres, élevée dans le télencéphale (T), le précurseur du cortex cérébral et de plusieurs structures subcorticales telles que l'hippocampe et le bulbe olfactif. L'image représente une coupe sagittale d'un embryon de souris E17.5 (adaptée de Nadeau et al., 1997). [B] Dans l'hippocampe murin, l'expression de l'ARNm de DLK (mauve) est concentrée au gyrus denté et aux régions CA1, CA2 et CA3 (adaptée de Blouin et al., 1996). [C–D] DLK (rouge) colocalise avec [C] les microtubules (vert) et [D] l'appareil de Golgi (vert). Le noyau est marqué en bleu (adaptée de Hirai et al., 2002).

1.5.1 Voies de signalisation régulées par DLK et impliquées dans la croissance des neurites

Le principal axe de signalisation reliant DLK aux processus biologiques neuronaux et, plus particulièrement, la neuritogenèse est celui qui est décrit par la phosphorylation de la kinase N-terminale de c-Jun (JNK) par MKK4/7, respectivement, les MAPK et MAPKK en aval de DLK (Gallo et Johnson, 2002). JNK phosphoryle plusieurs substrats, à son tour, tels que le proto-oncogène c-Jun, un facteur de transcription, aux sérines 63 et 73 (Figure 8) (Herdegen et al., 1998). Ce dernier active la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la croissance et la régénérescence des axones tels que le neuropeptide galanine, l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ et le récepteur de l'acide hyaluronique CD44 (Raivich et al., 2004). JNK est une importante régulatrice de l'organisation des microtubules et, pour cette raison, détient un rôle considérable dans la croissance des neurites. Cette régulation est médiée par la phosphorylation de plusieurs protéines associées aux microtubules. SCG10 déstabilise le cytosquelette des microtubules et la phosphorylation de cette dernière par JNK1 inhibe la dépolymérisation des microtubules et favorise l'élongation des neurites (Tararuk et al., 2006). La phosphorylation de DCX par JNK stimule la croissance des neurites et la migration des neurones (Gdalyahu et al., 2004; Jin et al., 2010). Map1b, Map2 et Tau sont également des substrats de JNK. La phosphorylation de Tau affecte grandement sa capacité à promouvoir l'assemblage des microtubules tandis que la phosphorylation de Map2 augmente sa capacité à lier les microtubules et favoriser l'assemblage de ces derniers (Yoshida et al., 2004; Chang et al., 2003). Autrement, JNK promeut l'élongation des microtubules et la croissance des axones en phosphorylant Map1b, une MAPs enrichie dans les régions distales de l'axones et les cônes de croissance (Yang et al., 2012; Bouquet et al., 2004). La liste des substrats de JNK est longue (Bogoyevitch et Kobe, 2006). Plusieurs autres facteurs de transcription sont régulés par la MAPK dont ATF-2 ('activating transcription factor 2'), un facteur de transcription possiblement impliqué dans la formation et la régénérescence des axones (Oliva et al., 2006). GAP-43 ('growth-associated protein 43 kDa'; neuromoduline), une protéine impliquée dans la croissance des axones, serait également phosphorylée, chez le rat, à la sérine 96 par JNK dans les cônes de croissance (Kawasaki et al., 2018). Le mécanisme

d'action de GAP-43 semble être la stabilisation de l'actine F (He et al., 1997; Denny, 2006). MARCKSL1 est une protéine qui lie l'actine filamenteuse. Lorsqu'elle est phosphorylée par JNK, MARCKSL1 induit l'empaquetage de l'actine F, diminue le remplacement ('turnover') de l'actine et, ainsi, retarde la migration des neurones, un processus étroitement relié à la croissance des neurites, en stabilisant le cytosquelette d'actine F (Björkblom et al., 2012). En somme, on constate que la voie de signalisation DLK-JNK régule de façon importante la dynamique et l'organisation du cytosquelette, particulièrement celle des microtubules par l'entremise de plusieurs MAPs (Figure 9).

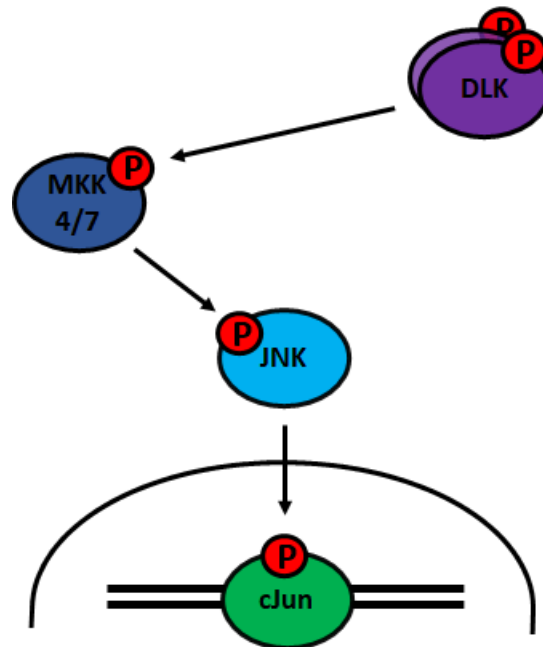


Figure 8. Axe de signalisation DLK – JNK. Les flèches représentent des événements de phosphorylation. La phosphorylation est représentée par les P encerclés de rouge. JNK phosphorylé transloque au noyau.

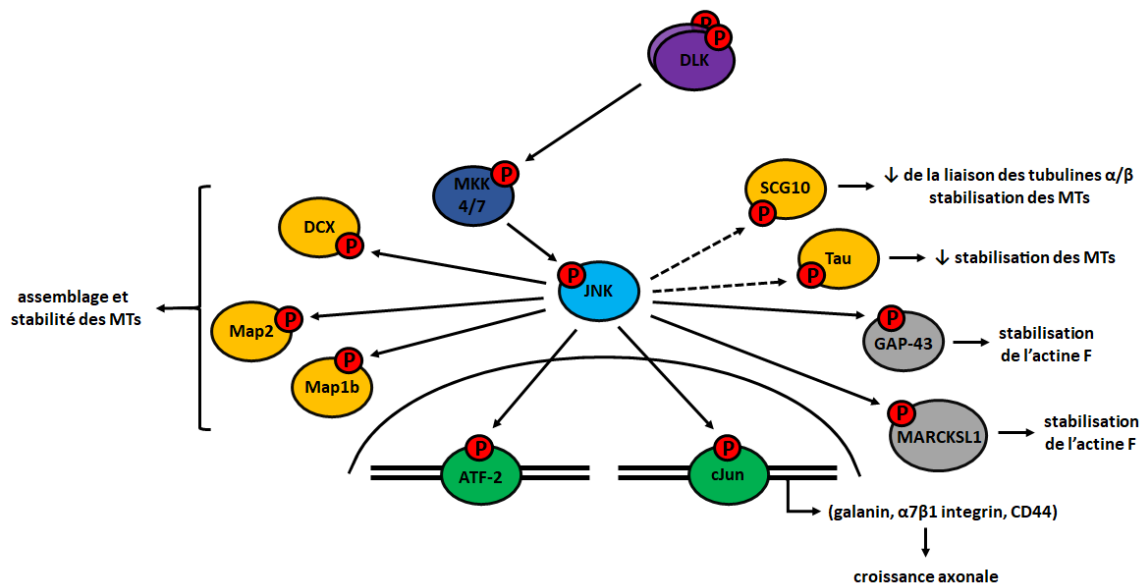


Figure 9. Régulation du cytosquelette lors de la neuritogenèse par l'axe de signalisation DLK – JNK. MTs; microtubules, actine F; actine filamenteuse. Les flèches pointillées représentent des événements de phosphorylation qui inhibent la protéine et contrent l'activité de celle-ci. Les inscriptions pointées par de courtes flèches directes exposent la conséquence de l'événement de phosphorylation représenté par le schéma.

1.5.2 Mécanismes moléculaires régulant DLK

Plusieurs modifications post-traductionnelles et interactions protéine – protéine contrôlent l'activité de DLK. Il a été démontré que PKA, une protéine kinase dont l'activité est régulée par

les niveaux cellulaires de l'AMPc, stimule directement DLK. La présence de ce dernier est nécessaire aux effets régénératifs de l'AMPc observés dans les DRGs après une atteinte aux axones (Hao et al., 2016). Les MAP4Ks MAP4K4, MINK1 et TNIK ont été identifiées comme activatrices de DLK en réponse au retrait de facteur de croissance dans les DRGs embryonnaires, un modèle de neurodégénérescence développementale (Larhammar et al., 2017). L'ubiquitine ligase E3 Phr1 ubiquitine DLK et condamne cette dernière au protéasome et à la dégradation. Après une atteinte neuronale, JNK phosphoryle DLK et réduit sa dégradation en interférant avec son ubiquitination par Phr1. L'augmentation de la stabilité de DLK crée une boucle de rétroaction positive qui amplifie et généralise, à travers le neurone, l'activation de JNK (Huntwork-Rodriguez et al., 2013). La palmitoylation est l'ajout d'acide palmitique, un acide gras saturé à 16 carbones, sur un résidu cystéine. Cette modification post-traductionnelle est associée, entre autres, au développement neural et à la plasticité synaptique (Fukata et Fukata, 2010). La palmitoylation est nécessaire à l'association de DLK aux vésicules de transport, à l'assemblage des complexes de signalisation et à la conservation de l'activité kinase. De cette façon, seulement la fraction liée aux vésicules est active. Ces propriétés confèrent à DLK un rôle important dans la signalisation rétrograde (axone → soma) en réponse à une lésion nerveuse (Holland et al., 2016). Tel que mentionné précédemment, DLK contient deux motifs 'leucine-zipper' permettant son homodimérisation. Cette interaction protéine – protéine est critique à l'autophosphorylation de DLK et l'activation subséquente de JNK (Nihalani et al., 2000). Ces événements sont inhibés par la protéine échafaud interagissant avec JNK (JIP-1) qui lie et, de cette façon, maintient DLK dans sa forme inactive. Cependant, JIP-1 permet également le rapprochement des composantes de l'axe de signalisation DLK – JNK et favorise leur stimulation lors de la dissociation du complexe DLK – JIP-1 (Nihalani et al., 2003). Similairement, la protéine MBIP est en mesure de lier DLK, empêcher sa dimérisation et inhiber ainsi l'activation de JNK (Fukuyama et al., 2000). Akt est une protéine kinase généralement associée à la survie et la croissance cellulaire qui est indispensable au renouvellement des cellules souches murines embryonnaires. Afin d'assurer ce renouvellement, Akt phosphoryle, entre autres, DLK à la sérine 584 et la thréonine 659 et inhibe les effets inducteurs de la différenciation que possède ce dernier (Wu et al., 2015). Le syndrome du X fragile (FXS) est une maladie génétique qui affecte, entre autres, le développement des neurones. Il est caractérisé

par une mutation du gène *fmr1* et, conséquemment, l'expression insuffisante de la protéine FMRP ('fragile X mental retardation protein'). Dans le FXS de la drosophile, cette carence conduit à une augmentation atypique de l'activité de Wallenda (Wnd), l'homologue de DLK chez la drosophile, et, ainsi, à une morphologie et physiologie neuronale aberrante. Ces défauts peuvent être contrés par la déplétion génétique de Wnd. En condition normale, dFRMP lie l'ARNm de Wnd, limite l'expression de la protéine et, de cette façon, module la signalisation de Wnd (Russo et DiAntonio, 2019). Bref, l'activité de DLK est régulée par plusieurs mécanismes différents qui influencent, entre autres, son activité kinase, sa localisation, son expression et sa dégradation (Figure 10). L'étude des mécanismes moléculaires neuronaux relatifs à DLK offre un aperçu des rôles prépondérants qu'elle remplit dans le système nerveux.

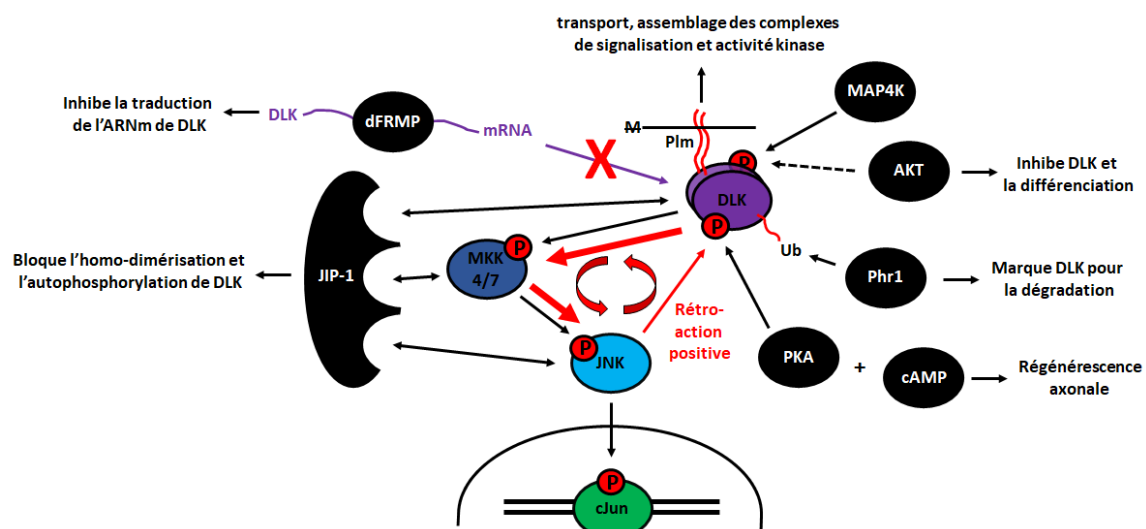


Figure 10. Mécanismes moléculaires régulant l'activité de DLK. M, membrane; Plm, palmitoylation; Ub, ubiquitine. La flèche pointillée représente un événement de phosphorylation

qui inhibe la protéine et contre l'activité de celle-ci. La flèche mauve symbolise la traduction de l'ARNm.

1.5.3 Rôles de DLK dans le système nerveux

Il a été démontré que la neurodégénérescence observée dans la maladie d'Alzheimer (AD) et la sclérose latérale amyotrophique (ALS) était régulée, entre autres, par DLK. La délétion et l'inhibition pharmacologique de celui-ci chez des souris modèles pour l'AD et l'ALS protègent les neurones contre les dommages causés par ces maladies. On remarque, alors, un prolongement de la survie des neurones, une préservation des synapses et une amélioration des fonctions cognitives et motrices (Le Pichon et al., 2017). DLK participe également à la mort des cellules ganglionnaires rétiniennes (RGCs). Son absence ou son inhibition pharmacologique augmente la survie des RGCs *in vitro* et *in vivo*, après l'écrasement du nerf optique (Welsbie et al., 2013). La dégénérescence Wallerienne est une dégradation programmée de l'axone endommagé et il a été démontré que DLK est aussi impliqué dans ce mécanisme (Miller et al., 2009). Les axones du système nerveux périphériques ont la capacité de se régénérer à la suite d'une blessure. Dans ce contexte, chez la souris, DLK est nécessaire au transport des signaux qui activent la régénérescence (Shin et al., 2012). De plus, Hammarlund et al. (2009) ont révélé que DLK est essentiel à la régénérescence même des neurones moteurs de *Caenorhabditis elegans*.

La formation du système nerveux sous-entend une production excessive de neurones qui doit être compensée par l'apoptose de ceux ne parvenant pas à réagir adéquatement aux signaux de survie (Yamaguchi et Miura, 2015). L'intégration au réseau neuronal nécessite la formation d'axones et de synapses qui, parfois, devront être détruits si la situation l'impose. Durant le développement, un plus grand nombre d'axones forment une plus grande quantité de connexions. Les axones qui ne parviennent pas à s'intégrer fonctionnellement à l'architecture

neurale seront élagués de l'arborescence axonale (Luo et O'Leary, 2005). Leur dégénérescence permet ainsi le remodelage du circuit neuronal en formation. Lorsque DLK est absent, plusieurs populations de cellules neuronales embryonnaires murines exhibent une réduction de l'apoptose et les axones des neurones observés dans les explants de ganglions spinaux (DRGs) n'exprimant pas DLK se dégénèrent minimalement (Ghosh et al., 2011).

Les rôles de DLK durant le développement du système nerveux incluent également la formation des axones, la migration neuronale, l'apoptose et la dégénérescence axonale. Les souris $DLK^{-/-}$ présentent plusieurs faisceaux d'axones hypoplasiques tels que ceux de la commissure antérieure et du corps calleux (Figure 11A). L'extension des axones des neurones pyramidaux du néocortex est également affectée. Les axones sont nettement moins allongés lorsque DLK est absent (Figure 11B). Dans ce modèle mutant, la migration radiale des neurones, c'est-à-dire la migration vers la périphérie du néocortex, est aussi déficiente. Les souris $DLK^{-/-}$ meurent peu de temps après la naissance (Hirai et al., 2006). Ces observations et plusieurs autres démontrent l'implication de DLK dans la croissance axonale, la migration des neurones et, ainsi, la formation du cortex cérébral.

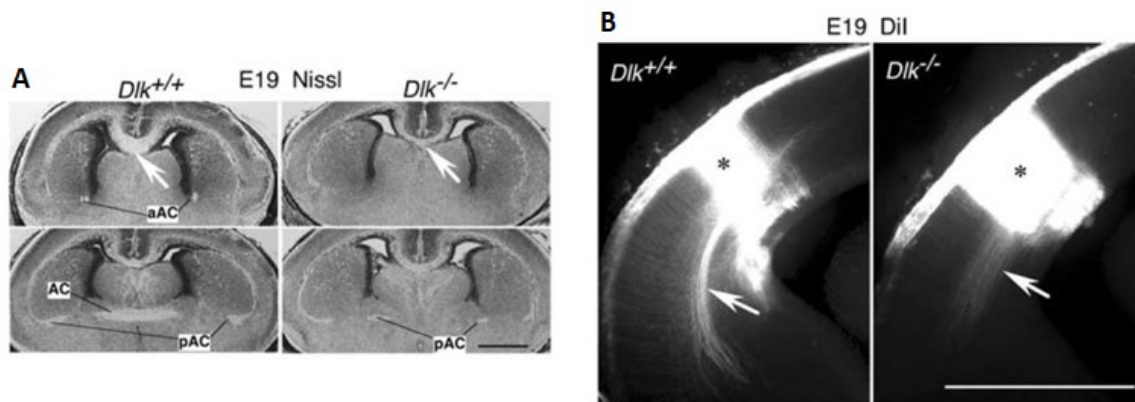


Figure 11. Les souris $DLK^{-/-}$ présentent une fasciculation axonale déficiente (adaptée de Hirai et al., 2006). [A] Section coronale de cerveau d'embryon E19 de souris type sauvage ($DLK^{+/+}$) et mutante homozygote ($DLK^{-/-}$). Le corps calleux (flèche blanche) et la partie antérieure (aAC) et postérieure (pAC) de la commissure antérieure (AC) sont sous-développés. La coloration de Nissl met en évidence les corps de Nissl, des agrégats de réticulum endoplasmique rugueux présents dans le corps cellulaire des neurones. Les axones apparaissent, donc, plus clairs puisqu'elles sont dénudées de ces granules. [B] Marquage d'axones ventralement allongés à partir de neurones corticaux provenant de souris sauvage ($DLK^{+/+}$) ou mutante homozygote ($DLK^{-/-}$). L'absence de DLK affecte la croissance axonale. La coloration Dil marque les membranes.

1.6 Hypothèse et objectif

Les derniers paragraphes ont pris soin d'exposer le rôle de DLK dans le développement des neurones et les mécanismes moléculaires par lesquels elle parvient à exercer cette fonction. L'axe de signalisation DLK–JNK régule notamment la formation et la croissance des neurites

en affectant l'organisation et l'assemblage du cytosquelette. Les protéines associées aux microtubules sont en grande partie responsables de ce dynamisme cytosquelettique et sont d'importants effecteurs de l'axe de signalisation DLK–JNK. Cependant, il existe probablement plusieurs autres effecteurs de cet axe qui ciblent le cytosquelette. Nous supposons alors que l'identification de nouveaux effecteurs de la cascade de signalisation DLK–JNK révélera des protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette qui participent au changement morphologique observé lors de la neuritogenèse.

Afin de confirmer cette hypothèse, il était nécessaire d'identifier ces effecteurs et de caractériser leur rôle dans la neuritogenèse. Les effecteurs ont été révélés grâce à une analyse du phosphoprotéome de cellules Neuro-2a stablement déplétés de DLK et différenciés par un traitement à l'acide rétinoïque. Cette lignée cellulaire issue d'un neuroblastome murin a été déplétée de DLK grâce à l'utilisation d'ARN interférents.

Les cellules Neuro-2a peuvent effectivement être différenciées par l'acide rétinoïque. Après un tel traitement, elles présentent un phénotype morphologique neuronal et cessent de croître (Blanco et al., 2001). La diminution de la concentration de sérum dans le milieu de culture qui accompagne le traitement à l'acide rétinoïque induit rapidement l'expression de facteurs nécessaires à la croissance des neurites et la différenciation des cellules Neuro-2a tels que EGFR, ERK1/2, Akt et le facteur de transcription c-Fos. Autrement, le traitement à l'acide rétinoïque ne semble pas favoriser le développement de neurones dopaminergiques (Tremblay et al., 2010). En fait, certains groupes de recherche auraient remarqué qu'il induirait plutôt la production d'acétylcholine, un neuromodulateur impliqué, entre autres, dans le contrôle des comportements adaptatifs répondant aux stimuli environnementaux (Manaba et al., 2005; Picciotto et al., 2012). Bref, les cellules Neuro-2a sont largement utilisées pour étudier la différenciation neuronale.

CHAPITRE 2

ARTICLE

2.1 Une analyse quantitative du phosphoprotéome identifie la nestine comme un médiateur potentiel des effets de la voie de signalisation DLK sur la croissance des neurites

2.1.1 Présentation de l'article

À notre connaissance, l'analyse du phosphoprotéome de neurones déplétées de DLK n'avait pas encore été réalisée. Elle aura permis de révéler un nouveau mécanisme par lequel DLK stimule la formation et l'élongation des neurites. L'activation de DLK lors de la différenciation des neurones conduit à la phosphorylation de la nestine, ce qui réduit la stabilité de cette dernière. Dans cet article, nous avons démontré que la déplétion de la nestine induit la neuritogenèse et avons conclu, grâce à l'expression de mutants phospho-déficient et phospho-mimétique, que la réduction de sa stabilité devait avoir le même effet et, ainsi, être nécessaire à la croissance des neurites.

Les rôles de DLK dans le système nerveux ont été décrits précédemment. Ils sont nombreux et d'une grande importance. Il convient, donc, d'identifier les mécanismes moléculaires qui les soutiennent afin d'enrichir notre compréhension au sujet du développement et du fonctionnement des neurones et, peut-être, utiliser ces nouvelles connaissances pour sélectionner de meilleures cibles thérapeutiques ou favoriser la réparation du système nerveux central.

Mon directeur de recherche et moi avons conçu le projet et planifié les expériences. J'ai effectué toutes les manipulations expérimentales requises et analysé les résultats. Une partie de la rédaction du manuscrit a été réalisée par moi et l'autre par mon directeur de recherche.

2.1.2 Page de présentation du manuscrit

Quantitative phosphoproteomics identifies nestin as a potential mediator of DLK-dependent neurite outgrowth

Guillaume St-Cyr¹ and Richard Blouin¹

¹Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

Email addresses of authors:

ID@USherbrooke.ca

ID@USherbrooke.ca

To whom correspondence should be addressed: Richard Blouin, Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, 2500 Boul. de l'Université, Sherbrooke, Québec, Canada J1K 2R1, Tel.: (819) 821-8000 ext. 00000; Fax: (000) 000-0000; E-mail: ID@USherbrooke.ca

2.1.3 Abstract

DLK (dual leucine zipper kinase) is a neuronal kinase implicated in brain development and function. Indeed, in the absence of DLK, neurons fail to extend axons both in cell culture and *in vivo*. However, exactly how DLK mediates axon growth remains to be established. To gain additional insights into the molecular mechanisms of DLK function, we performed a quantitative phosphoproteome analysis of retinoic acid (RA)-differentiated Neuro-2a mouse neuroblastoma cells following knockdown of DLK by RNA interference. Among the proteins that showed decreased phosphorylation in response to DLK depletion was nestin, a cytoskeletal protein typically expressed during early stages of central nervous system and muscle tissue development. Characterization of the identified phosphorylation sites using phosphomimetic and phosphodeficient nestin mutants showed that DLK-mediated phosphorylation within the C-terminal domain down-regulates nestin abundance, suggesting an alteration in protein stability. Functionally, this reduction in nestin protein stability is consistent with a role in neuronal differentiation, as ectopic expression of phosphodeficient nestin mutant in Neuro-2a cells compromises RA-induced neurite outgrowth while knockdown of nestin alone significantly increases neurite formation and elongation. Together, our data identify nestin as a potential target of the DLK signaling pathway and suggest a novel mechanism underlying DLK regulation of neurite outgrowth.

2.1.4 Introduction

Neuronal differentiation is fundamental to the development and regeneration of the nervous system. During this process, newly born neurons cease proliferating and undergo profound morphological changes which result first in the formation of neurites at the cell surface. Subsequently, these neurites elongate and branch to form axons and dendrites in mature neurons, promoting the assembly of functional neuronal circuits. In keeping with its complexity, neurite

outgrowth is controlled by a huge number of cell-extrinsic and -intrinsic factors. Prominent among these are neurotrophic factors, retinoids, extracellular matrix (ECM)-associated proteins, cell adhesion molecules (CAMs), intracellular protein kinases, small GTPases, cytoskeletal components and transcription factors ¹⁻³.

Dual leucine zipper kinase (DLK) is an attractive candidate regulator of neuronal process outgrowth and maintenance due to its divergent functional properties. This protein acts as component of the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway ⁴, which, in addition to its role in the transduction of signals from cytokines, growth factors and environmental stress, contributes to brain development and synaptic plasticity ⁵. Depending on the origin of neurons, developmental stage and physiological context ⁶, it has been reported that DLK can stimulate axon growth and axon regeneration as well as axon degeneration and neuronal cell death. Clues regarding the involvement of DLK in the positive regulation of neurite and axon formation are derived from studies showing that inactivation of the murine DLK gene results in abnormal brain development, characterized by defects in axon growth and neuronal migration ⁷. Consistent with this report, the loss of DLK was shown to impair axonal growth in optic and sciatic nerve crush injury mouse models ^{8,9}, suggesting that DLK is required for axon regeneration in the peripheral nervous system (PNS). Furthermore, DLK was identified as an essential mediator of the pro-regenerative effects of cAMP on axon growth in mouse dorsal root ganglion (DRG) neurons ¹⁰. In addition to the above-mentioned reports, it was found that the genetic deletion of DLK in non-regenerating central nervous system (CNS) neurons significantly attenuates the axonal degeneration and neuronal cell death caused by mechanical injury and glutamate-induced excitotoxicity ¹¹⁻¹⁴, or observed in amyotrophic lateral sclerosis and Alzheimer's disease mouse models ¹⁵. Taken together, these data suggest that DLK, in addition to its role in neural development, acts as a sensor of axon injury in neurons of the PNS and CNS to mediate axon regeneration and degeneration, respectively.

From a mechanistic point of view, little is currently known about how DLK regulates neurite and axon outgrowth. One of the mechanisms potentially contributing to this response is perturbation of microtubule dynamics, since loss of DLK in mice resulted in reduced phosphorylation of the microtubule-stabilizing proteins doublecortin, MAP2c and MAP1B ^{7,16}, which are known to be implicated in neurite outgrowth ¹⁷⁻¹⁹. Knockout studies in mice have also shown that the absence of DLK impairs the injury-induced axonal retrograde transport of phosphorylated c-Jun and STAT3 ⁸, two transcription factors promoting axon regeneration in the PNS ^{20,21}. Another indication of the mechanisms involved in DLK regulation of neurite and axon outgrowth is the recent report from our laboratory that DLK signaling in differentiated mouse neuroblastoma Neuro-2a cells regulates expression of many genes recognized for their roles in neurite outgrowth and axon guidance, including neuropilin 1 and plexin A4 ²².

To further explore how DLK regulates neurite and axon outgrowth, we investigated the impact of DLK loss on the phosphoproteome of retinoic acid (RA)-differentiated Neuro-2a cells using a iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantitation) quantitative proteomics strategy. Among the proteins showing reduced phosphorylation in DLK-depleted cells when compared to control cells was nestin, an intermediate filament (IF) type VI protein expressed predominantly in neural progenitor cells (NPCs) ^{23,24}. Interestingly, phosphomimetic, but not phosphodeficient, mutation of the DLK-mediated phosphorylation sites found in nestin reduced its abundance, suggesting that phosphorylation might play a role in regulating nestin stability. The decrease in nestin abundance appears necessary for neuronal differentiation, since knockdown of nestin alone was sufficient to induce spontaneous neurite formation in Neuro-2a cells. Taken together, our results provide the first evidence of a functional link between DLK and nestin, and highlight a novel mechanism for regulation of neurite outgrowth.

2.1.5 Results

Generation and characterization of a Neuro-2a cell model to investigate the molecular mechanisms of DLK-mediated neurite outgrowth. DLK has been recognized as a key regulator of nervous system development and regeneration because of its ability to modulate axon growth^{7,25,26}. In keeping with this, we previously used the established mouse neural crest-derived cell line Neuro-2a to show that transient depletion of DLK results in inhibition of neurite outgrowth²². To investigate more precisely how DLK contributes to neuritogenesis, we first generated stable Neuro-2a cell lines in which DLK expression was down-regulated by RNA interference. To do so, Neuro-2a cells were infected with lentiviral vectors expressing two different short hairpin RNAs (shRNA) that target mouse DLK mRNA (sh73 and sh69), followed by selection with puromycin for several days and expansion. As a negative control, cells were also infected with an empty lentiviral vector (pLKO.1). Silencing of DLK expression in cells grown under proliferating (DMEM with 10% FBS) or differentiating (DMEM with 2% FBS + 20 μ m retinoic acid (RA) for 24 h) conditions was confirmed by immunoblot analysis. The results shown in Fig. 12a and 12b demonstrate that DLK protein expression decreased by about 50 % and 75 % in cells infected with the sh69 and sh73 DLK shRNA constructs, respectively, when compared with control cells. Parallel immunoblot analyses with antibodies specific to the phosphorylated, activated forms of JNK and c-Jun, two downstream targets of DLK, revealed that DLK depletion compromises substantially the strong activation of JNK and c-Jun induced by RA (Fig. 12a and 12b), suggesting a role for DLK in this response. Interestingly, given the demonstrated contribution of c-Jun in regulating its own transcription²⁷, we accordingly observed a significant decrease of its abundance in DLK-depleted cells exposed to RA. Taken together, this shows that DLK is required for activation of JNK and c-Jun upon RA-induced differentiation of Neuro-2a cells.

To determine whether DLK depletion impairs neurite outgrowth in our sh69 and sh73 Neuro-2a cell lines, we examined over a period of 48 h their morphological response to differentiating

conditions using the IncuCyte® S3 Live-Cell Analysis System for Neuroscience and Incucyte® NeuroTrack Software Module (Fig. 12c). In contrast to control cells, which showed extensive neurite outgrowth after RA treatment, we consistently observed fewer and shorter neurites in both sh69/DLK- and sh73/DLK-depleted Neuro-2a cell lines, the latter showing a greater defect in neurite formation (Fig. 12c and 12d). In addition to being consistent with the demonstrated role of DLK in axon formation²⁸ and elongation⁷, these data confirm that its presence in Neuro-2a cells is crucial for neuritogenesis to proceed. Because the sh73/DLK-depleted Neuro-2a cells showed a more significant reduction in neurite outgrowth induced by RA treatment, we performed the following experiments using this cell line.

Quantitative phosphoproteomic analysis of DLK-depleted Neuro-2a cells undergoing RA-induced differentiation. The depletion of DLK in Neuro-2a cells alters RA-induced differentiation, as evidenced by deficient neurite outgrowth. This is probably due, at least in part, to decreased phosphorylation and activity of JNK and c-Jun (Fig. 12), which are both implicated in neurite outgrowth^{29,30}. Because DLK's role in neurite outgrowth has not been exhaustively characterized at the molecular level, we speculated that other effector proteins are involved in this response. To identify such unknown effectors of DLK-dependent neurite outgrowth, we examined the phosphoproteome of control (pLKO.1) and sh73/DLK-depleted Neuro-2a cells treated with RA for 24 h using the workflow shown in Fig. 13a. Briefly, after protein extraction and digestion, the resulting peptides were labeled with iTRAQ reagents to quantify protein abundance, pooled in equimolar amounts and subjected to a phosphopeptide purification step using TiO₂ particles. Enriched phosphopeptides were then identified and quantified by mass spectrometry. In total, this protocol allowed us to detect and quantify 4942 phosphopeptides on 2123 unique proteins from two independent biological replicates, each one with two technical replicates. As our goal was to identify potential effectors of DLK, we concentrated on phosphopeptides showing at least 1.5-fold change and P value less than 0.05 between control and DLK-depleted cells. This statistical analysis revealed that only 40 phosphopeptides belonging to 30 proteins were significantly affected by DLK depletion, the majority of them being down-regulated (Fig. 13b, Table 1).

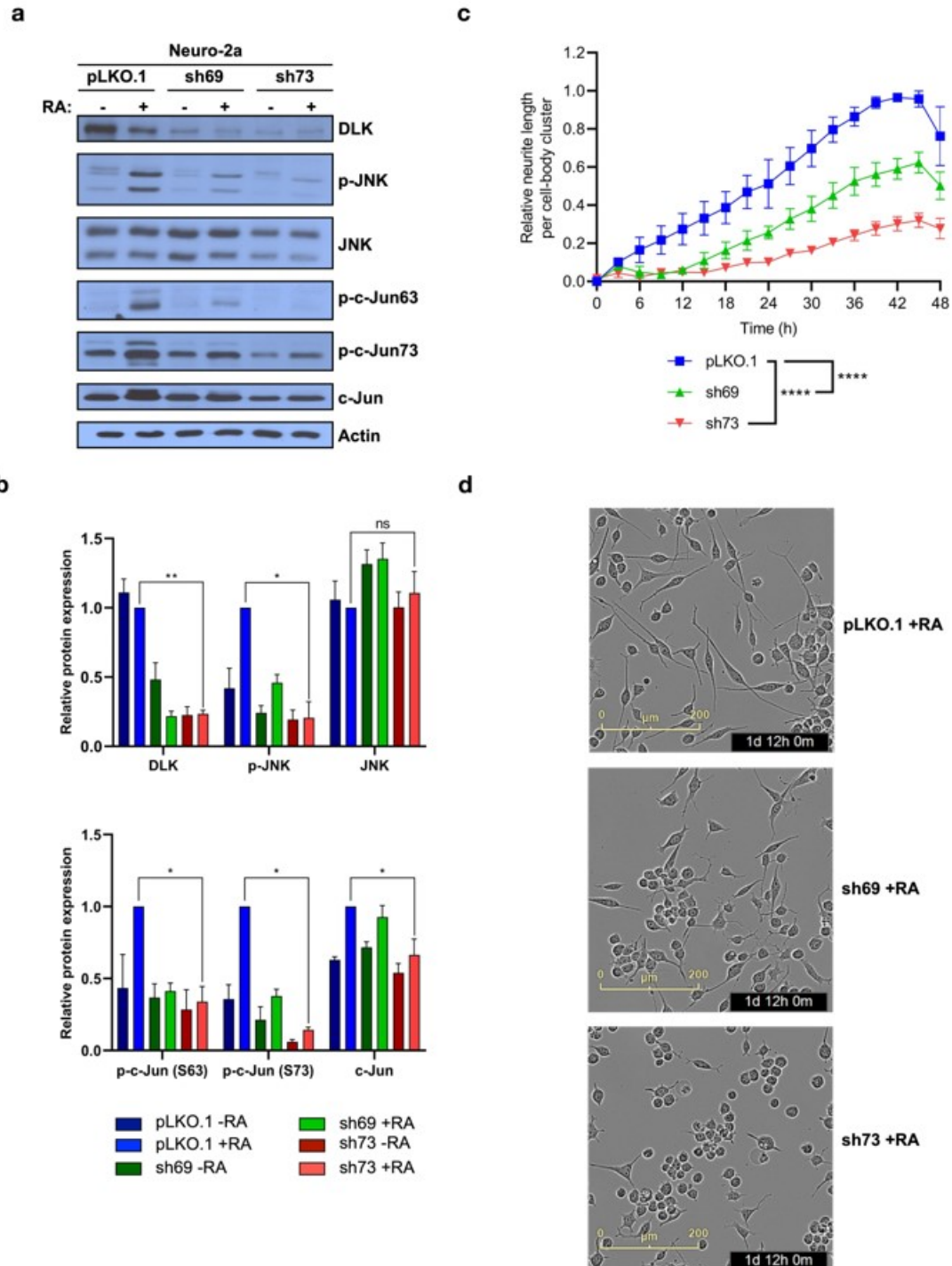
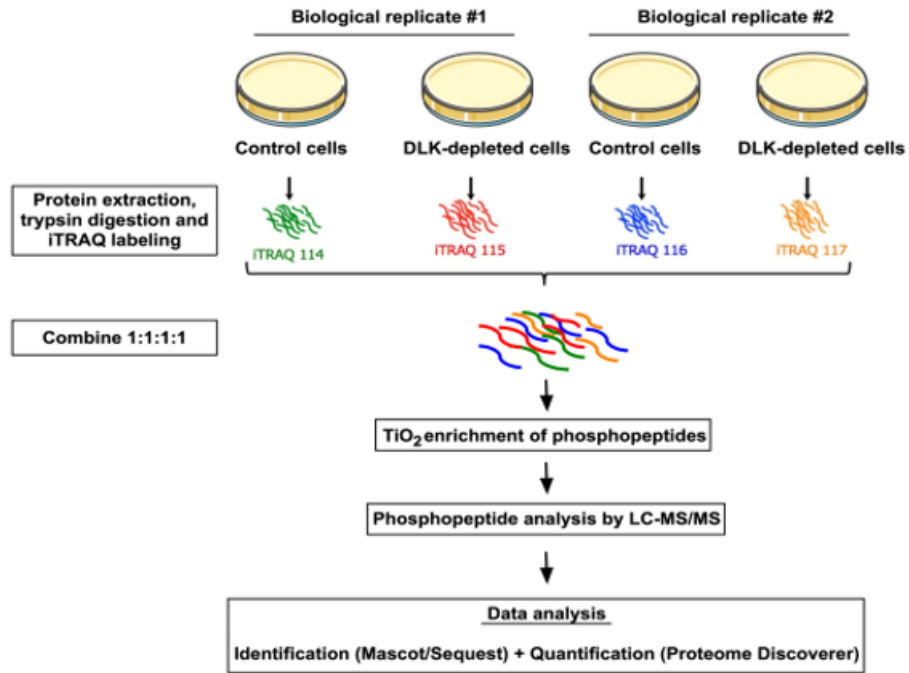


Figure 12. Knockdown of DLK in Neuro-2a cells.

Figure 12. Knockdown of DLK in Neuro-2a cells. Neuro-2a cells were infected with an empty lentiviral vector (pLKO.1) or with lentivirus expressing mouse DLK shRNAs (sh69 and sh73), followed by selection with puromycin to establish stable cell lines. (a) Representative Western blots showing levels of DLK, phospho-JNK, total JNK, phospho-c-Jun (Ser-63 or Ser-73), c-Jun and actin in control and DLK-depleted Neuro-2a cells incubated without (-) or with (+) 20 μ M retinoic acid (RA) for 24 h. Bands of interest were cropped from different blots and grouped together. Full-length blots are presented in Fig. 18. (b) Quantification of DLK, phospho-JNK, total JNK, phospho-c-jun (Ser-63 or Ser-73) and c-Jun protein levels in control and DLK-depleted cells. All chemiluminescent signals were quantified using the Image Studio Lite version 5.2 software (LI-COR) and normalized to the actin level in control cells exposed to RA. Data represent the mean \pm SEM (error bars) from three independent experiments. To simplify, only the statistical analysis done for the sh73/DLK-depleted Neuro-2a cells treated with RA is shown. NS, non-significant; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. (c) Neurite length per cell-body cluster (mm/mm^2) was measured every 3 h in control and DLK-depleted cells that were exposed to RA for 48 h. Background values (time 0 after exposure to RA) were subtracted from each data point before normalization to the maximal value obtained. Data are expressed as relative changes in neurite length and represent the mean \pm SEM of three independent experiments carried out in triplicate. Linear regression analysis was performed using all data points to compare neurite outgrowth in control and DLK-depleted cells and evaluate statistical significance. ****, $p < 0.0001$. (d) Representative phase contrast images of control (pLKO.1) and sh69/ or sh73/DLK-depleted Neuro-2a cells cultured in differentiation medium for 36 h. Scale bar, 200 μm .

a



b

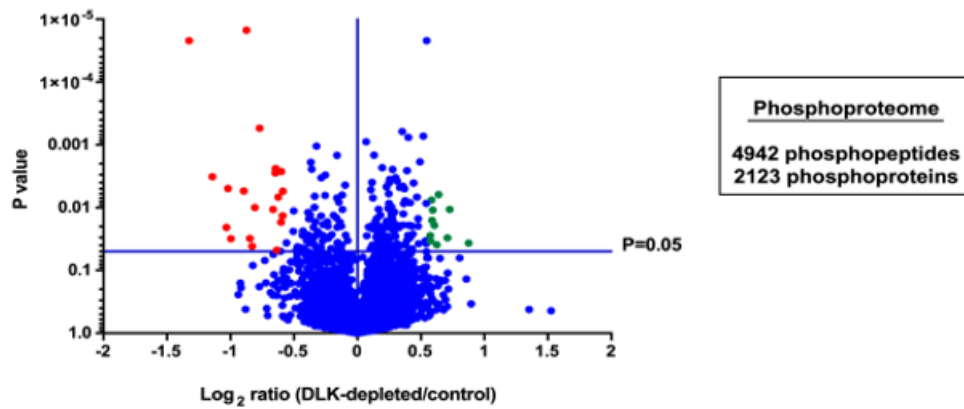


Figure 13. Quantitative phosphoproteomics analysis of Neuro-2a cells after DLK depletion.

Figure 13. Quantitative phosphoproteomics analysis of Neuro-2a cells after DLK depletion. (a) Scheme of the experimental procedure used to identify phosphopeptides that were either down-regulated or up-regulated in DLK-depleted cells after treatment with RA when compared to control cells. (b) Volcano plot showing \log_2 (-fold change) versus p value of all phosphopeptides (DLK-depleted/control) identified by mass spectrometry. Phosphopeptides that were down-regulated and up-regulated at least 1.5-fold in DLK-depleted cells are shown in red and green, respectively.

Table 1. Proteins with decreased (red) or increased (green) phosphorylation by 1.5-fold or more in DLK-depleted cells.

Protein name	Gene symbol	Log2 fold-change	P-value	Phosphopeptide sequence
Nestin	Nes	-1,32	2,20E-05	APLVGSPVHLGPSQPLK
Transcription factor AP-1	Jun	-1,14	3,22E-03	LASPELER
Histone H1.1	Hist1h1a	-1,03	2,06E-02	GTGAAGSFK
Transcription factor AP-1	Jun	-1,02	4,94E-03	NSDLLTSPDVGLLK
Anion exchange protein	Slc4a7	-1,00	3,14E-02	GNGSGGSRENSTVDFSK
Histone H1.4	Hist1h1e	-0,95	9,89E-03	GTGASGSFK
ATP-citrate synthase	Acly	-0,89	5,45E-03	TASFSESR
Nestin	Nes	-0,87	1,50E-05	VSQVSLESLEKENVQSPR
Protein prune homolog 2	Prune2	-0,85	3,10E-02	DSGPESPGRTPPEFLSLSLDK
Eukaryotic translation initiation factor 4B	Eif4b	-0,83	4,14E-02	SSNPPARSQSSDTEQPSPTSGGGK
Anion exchange protein	Slc4a7	-0,81	9,94E-03	GSLIQIPVK
MARCKS-related protein	Marcks1	-0,77	5,44E-04	AAATPESQEPQAK
Transcriptional regulator ATRX	Atrx	-0,66	1,07E-02	QTESNPAMSNSDEESNGTMK
Neural cell adhesion molecule 1	Ncam1	-0,65	2,80E-03	DESKEPIVEVR
Pogo transposable element with ZNF domain	Pogz	-0,64	2,38E-03	SLDAEPSVPSAAKPSSPEK
RNA-binding protein 28	Rbm28	-0,63	4,79E-02	VEEQVEDSDDEEDDDSHDDEER

Protein name	Gene symbol	Log2 fold-change	P-value	Phosphopeptide sequence
Band 4.1-like protein 3 isoform 8	Epb41l3	-0,63	3,16E-02	TDTAADGETSATSDQEEDAEIK
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	Srrm2	-0,62	6,79E-03	RSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSDSEGSSLPAQPEVALK
Bromodomain-containing protein 7	Brd7	-0,60	4,97E-02	SLQDLDMSSPEDEGQTR
Anion exchange protein	Slc4a7	-0,60	1,70E-02	SFADIGK
Rho guanine nucleotide exchange factor 2	Arhgef2	-0,60	2,67E-03	EAQELGSPEDR
Nuclear ubiquitously and cyclin-dependent kinase substrate 1	Nucks1	-0,59	1,34E-02	NSQEDSEDSEEKDVK
A-kinase anchor protein 12	Akap12	-0,59	5,48E-03	AEADASGNLTKESPDTNGPK
Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate	Marcks	0,59	7,57E-03	GEATAERPGEAAVASSPSKANGQENGHVK
Myb-binding protein 1A	Mybbp1a	0,59	1,60E-02	DIPSDTQSPVSTKR
Interferon gamma receptor 1	Ifngr1	0,59	1,09E-02	ALEAGGSTSAMTPDSPPTPTQR
T-box transcription factor TBX2	Tbx2	0,61	1,92E-02	SAAPLGRSPSRDASPAR
Protein SET	Set	0,63	3,90E-02	SASPGLPK
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 34	Usp34	0,64	6,20E-03	EVLTPSTSDNETR
MARCKS-related protein	Marcks1	0,71	3,03E-02	EGGGDSSASSPTEEQEQGEMSACSDEGTAQEGK
La-related protein 1	Larp1	0,73	1,07E-02	AVTPVPTKTEEVSNLK
5'-3' exoribonuclease 2	Xrn2	0,88	3,68E-02	RNSLGGDVLFVGK

Among the phosphopeptides showing decreased abundance in DLK-depleted cells, some were of particular interest in the context of this study because of the association of the corresponding proteins with processes related to neuronal development. For instance, consistent with the immunoblotting data presented above, we found that phosphorylation of Ser-63 and Ser-73 on c-Jun significantly decreased upon DLK depletion. These two serine residues are phosphorylated by JNK in response to various stimuli and involved in the transcriptional activation of c-Jun, a key regulator of axonal regeneration³¹. Our phosphoproteomics data also revealed that phosphorylation of neural cell adhesion molecule 1 (Ncam1) at Ser-774 was down-regulated 1.6-fold by depletion of DLK. Ncam1 is a cell adhesion molecule involved in development of the nervous system and its phosphorylation at Ser-774 has been found to

contribute to neurite outgrowth³². Finally, two other phosphorylation sites that significantly decreased in DLK-depleted cells corresponded to Ser-894 and Ser-1837 of the IF family member nestin^{23,24}.

Although Ser-894 and Ser-1837 of nestin are known to be phosphorylated in different cellular contexts^{33–35}, no investigations of the role they play in nestin regulation and/or function have been reported so far. We therefore selected nestin for further biochemical validation and examination of its functional link with neurite outgrowth. Because phosphorylation site-specific antibodies to Ser-894 and Ser-1837 of nestin were not available from commercial sources, we confirmed the validity of these candidate phosphopeptides in control and DLK-depleted cells by parallel reaction monitoring (PRM) mass spectrometry, a sensitive targeted proteomics method for selective and accurate quantification of multiple proteins or peptides simultaneously³⁶. Using this approach, we found that the phosphorylation levels of Ser-894 and Ser-1837 of nestin were significantly reduced following DLK knockdown compared to the control condition (Fig. 14). Moreover, DLK depletion led to an expected and dramatic decrease in the abundance of phosphopeptides containing Ser-63 and Ser-73 of c-Jun (Fig. 14), demonstrating the efficacy of the PRM procedure. Altogether, these data strongly suggest that DLK acts as a regulator of nestin phosphorylation in Neuro-2a cells undergoing RA-induced differentiation.

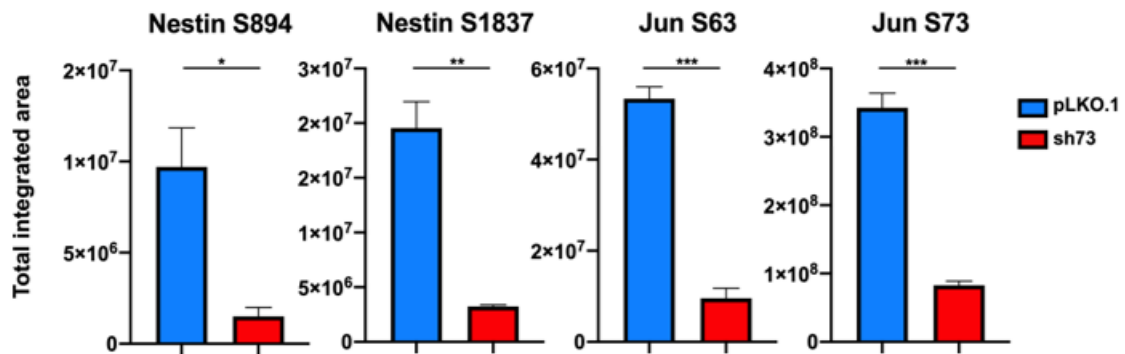


Figure 14. DLK depletion reduces the phosphorylation level of Ser-894 and Ser-1837 on nestin. The amount of peptides of nestin with phosphorylated serine residues at positions 894 and 1837 or c-Jun with phosphorylated serine 63 and serine 73 in control and DLK-depleted cells was quantified using a PRM strategy. Integrated areas of the three major fragment ions obtained in the MS-MS spectrum of each phosphopeptide were determined, summed, and normalized to exogenous spike-in cytochrome c peptides. Data represent the mean \pm SEM of three separate experiments. Statistical significance was determined using a two-tailed unpaired Student's t test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Nestin phosphorylation at Ser-894 and Ser-1837 results in protein instability. To understand the role that phosphorylation at Ser-894 and Ser-1837 plays in regulating the function of nestin, we constructed a series of phosphomimetic and phosphodeficient mutants incorporating single or double substitutions at these positions, and introduced them by transient transfection into Neuro-2a cells for expression analysis. Immunoblotting revealed that wild-type nestin and its

S894D, S894A, S1837D, S1837A and S894A/S1837A mutant species were all expressed at equivalent levels, except for mutant S894D/S1837D, which was approximately 50% less abundant (Fig. 15a and 15b). The reduced amount of nestin seen in this case did not reflect lower transfection efficiency of the phosphomimetic double mutant since all constructs, which also contain an independent transcription unit encoding neomycin (Neo) phosphotransferase II, expressed the Neo protein at similar levels (Fig. 15a and 15c).

To further confirm that the S894D/S1837D construct was fully functional in terms of transcriptional activity, we measured its expression at the mRNA level by RT-qPCR and compared it with those of the wild-type and double phosphodeficient mutant nestin. Because transfected nestin transcripts had a phage M13 sequence upstream of their polyadenylation signal, it was possible to distinguish them from endogenous nestin mRNA using specific PCR primers. As is the case for neomycin mRNA levels, which were used to monitor transfection efficiency, no statistically significant variations in expression of nestin mRNA were observed between the different plasmid constructs (Fig. 15d and 15e). Therefore, these results suggest that the double phosphomimetic S894D/S1837D mutant has a lower abundance compared with all other nestin constructs, presumably because of its instability.

Exogenous expression of the double phosphodeficient S894A/S1837A nestin mutant affects neurite outgrowth. Because little is known about nestin's function in neuronal differentiation, we examined the consequences of overexpressing either wild-type, double phosphodeficient (S894A/S1837A) or double phosphomimetic (S894D/S1837D) nestin constructs on the ability of Neuro-2a cells to form neurites in response to RA. Using the Incucyte live cell imaging system, we measured neurite outgrowth in transfected cells cultured first in DMEM with 10% FBS for 48 h and then incubated in differentiation medium (DMEM with 2% FBS + 20 μ M RA) for a further 72 h. Interestingly, while none of the nestin constructs were found to significantly perturb neurite outgrowth in proliferating conditions, expression of the double phosphodeficient nestin mutant caused a substantial decrease in neurite outgrowth after RA addition when

compared to cells transfected with either wild-type nestin, nestin mutant S894D/S1837D or an EGFP control vector (Fig. 16). Taken together with the above results, these findings suggest that phosphorylation of nestin at Ser-894 and Ser-1837 plays a role in its overall stability and function in neurite extension.

Nestin depletion promotes neurite outgrowth. During neuronal differentiation, nestin expression is down-regulated and replaced by neurofilaments ³⁷, suggesting that it is a potential candidate regulator of neurite formation. This assumption is supported by our observation that exogenous expression of phosphodeficient nestin impairs neurite formation in Neuro-2a cells when compared with wild-type nestin and the less stable phosphomimetic nestin mutant. To directly assess whether nestin plays a role in neuronal differentiation, we transfected proliferating Neuro-2a cells with either control or nestin siRNAs and measured neurite outgrowth over a period of 72 h using the Incucyte live cell analysis system. Because endogenous levels of nestin in these cells were barely detectable by Western blot analysis, we confirmed the knockdown efficiency of nestin siRNAs by quantitative RT-PCR (Fig. 17a).

As shown in Figure 17b and 17c, cells transfected with nestin siRNAs extended significantly more neurites than control cells. This increase in neurite number became noticeable as early as 21 h post-transfection and remained progressive until the end of the experiment. At 72 h, nestin-depleted Neuro-2a cells had 3 times more neurite projections than did cells transfected with scrambled control siRNA. Thus, these results show that down-regulation of nestin expression promotes neurite outgrowth in Neuro-2a cells, suggesting a molecular mechanism through which the effect of DLK signaling on neurite outgrowth is mediated.

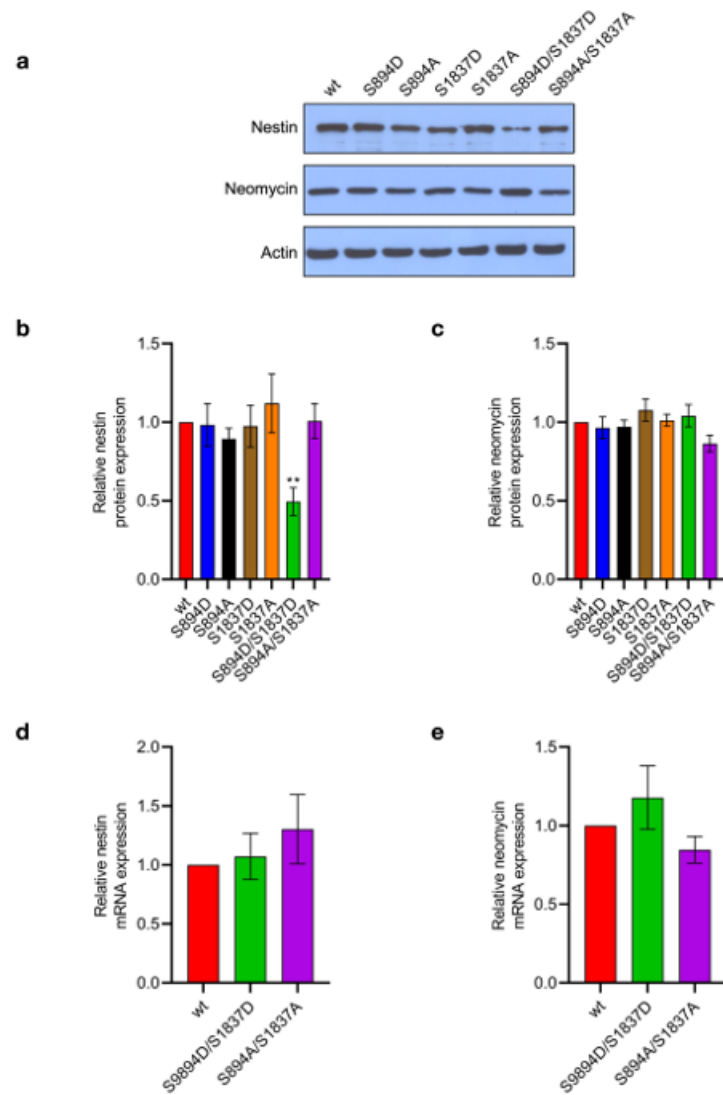


Figure 15. Phosphorylation of nestin at Ser-894 and Ser-1837 decreases its stability.

Figure 15. Phosphorylation of nestin at Ser-894 and Ser-1837 decreases its stability. Neuro-2a cells were transfected with either wild-type (wt) or mutant nestin plasmids (S894D, S894A, S1837D, S1837A, S894D/S1837D, S894A/S1837A) and harvested 48 h later for further analysis. (a) Representative Western blots showing the expression levels of nestin, neomycin and actin in transfected cells. Bands of interest were cropped from different blots and grouped together. Full-length blots are presented in Fig. 19. (b) Relative level of exogenous nestin abundance in transfected Neuro-2a cells. The double phosphomimetic S894D/S1837D nestin mutant was consistently present at lower levels than all other constructs. (c) Relative level of exogenous neomycin phosphotransferase protein expression in transfected cells. All chemiluminescent signals were quantified using the Image Studio Lite version 5.2 software (LICOR) and normalized to the actin level measured in cells transfected with the wild-type nestin plasmid. (d and e) Relative level of exogenously expressed nestin (d) or neomycin phosphotransferase (e) mRNA in cells transfected with wild-type (wt), phosphomimetic S894D/S1837D or phosphodeficient S894A/S1837D mutant nestin plasmids. The mRNA levels of nestin and neomycin phosphotransferase were analyzed by quantitative RT-PCR, normalized to three housekeeping genes (Sdha, Txnl4b, Gusb) and calculated with the $\Delta\Delta C_T$ method. Data represent the mean \pm SEM of three separate experiments. Statistical significance was determined by unpaired *t* test with Welch's correction (two tails). **, $p < 0.01$.

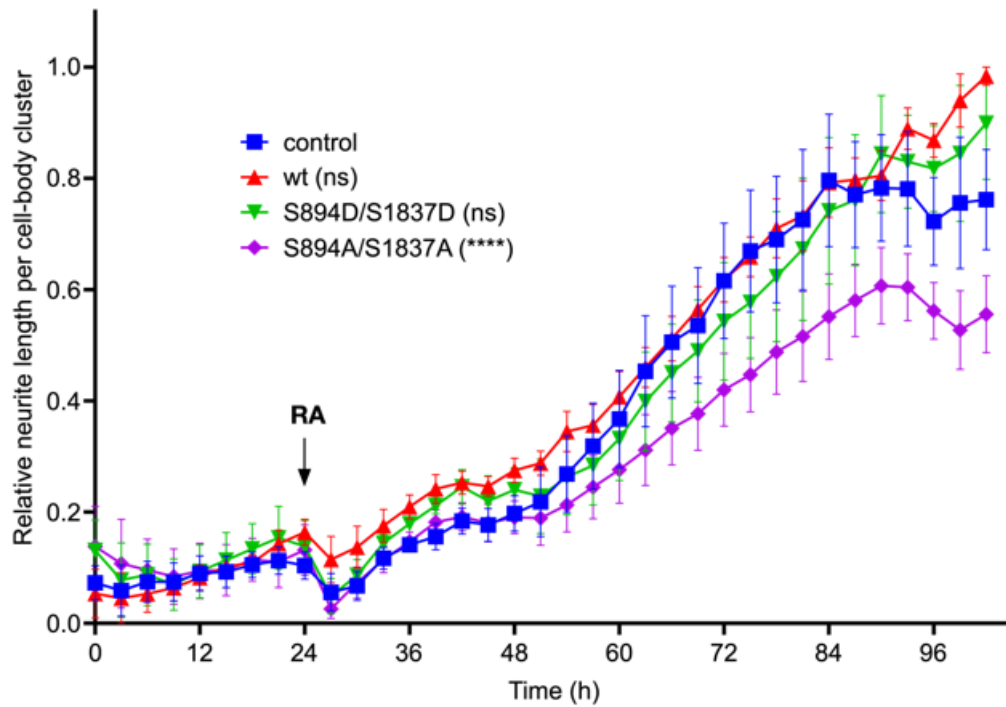


Figure 16. Expression of phosphodeficient S894A/S1837A nestin mutant impairs neurite outgrowth. Neuro-2a cells were transfected with plasmids expressing either EGFP (control), wild-type or mutant forms of nestin (S894D/S1837D, S894A/S1837A) and grown in proliferation medium for 48 h prior to differentiation with RA for 3 days. Neurite length per cell-body cluster (mm/mm^2) was measured every 3 h during the last 24 h of proliferation and the whole differentiation period. The background value was subtracted from each data point before normalization to the maximal value obtained. Data are expressed as relative changes in neurite length and represent the mean \pm SEM of three independent experiments carried out in triplicate. Linear regression analysis was performed using all data points to compare neurite outgrowth in transfected cells and evaluate statistical significance. NS, non-significant; ****, $p < 0.0001$.

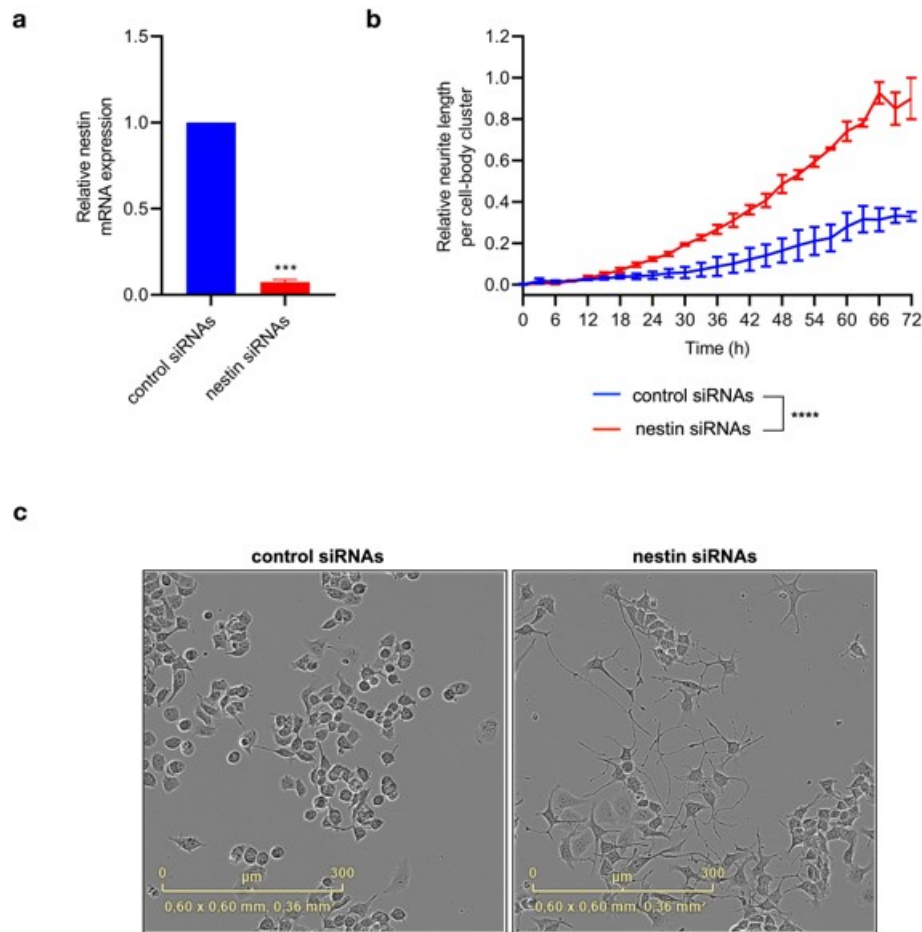


Figure 17. Depletion of nestin promotes neurite formation. Neuro-2a cells grown in proliferation medium were transfected with either non-targeting control or nestin-specific ON-TARGETplus SMARTpool siRNAs. (a) Relative level of nestin mRNA 2 days after transfection. Data represent the mean \pm SEM of three separate experiments. Statistical significance was determined by unpaired *t* test with Welch's correction (two tails) using GraphPad Prism version 8.0 software. **, $p < 0.01$. (b) Neurite length per cell-body cluster (mm/mm^2) was measured every 3 h for a total of 72 h in proliferation medium. The background

value (time 0 after transfection) was subtracted from each data point before normalization to the maximal value obtained. Data are expressed as relative changes in neurite length and represent the mean \pm SEM of three independent experiment carried out in triplicate. Linear regression analysis was performed using all data points to compare neurite outgrowth in transfected cells and evaluate statistical significance. ****, $p < 0.0001$. (c) Representative phase contrast images of control and nestin-depleted Neuro-2a cells 2 days after transfection. Scale bar, 300 μ m.

2.1.6 Discussion

DLK regulates nervous system development and regeneration in many model organisms, such as *Drosophila*, *C. elegans* and mice, through positive modulation of neurite outgrowth^{7,8,26,38}. However, exactly how DLK contributes to this process of fundamental importance in neurobiology remains a major unanswered question that we began to address in this study. As DLK presumably exerts its function in neurite outgrowth by catalyzing phosphorylation of specific effector proteins, either directly or indirectly, we performed a quantitative phosphoproteomics analysis of control and DLK-depleted Neuro-2a cells undergoing RA-induced differentiation to identify such target proteins. From this experiment, we observed that DLK loss significantly decreased or increased phosphorylation of about 30 proteins at specific sites. Among all identified proteins whose phosphorylation was markedly reduced by DLK knockdown, we decided to focus on the IF protein nestin because of its relevance to proliferation, differentiation and migration of stem cells, particularly those of the neural lineage³⁹.

IFs are a subgroup of cytoskeletal proteins that appear to play a structural or tension-bearing role^{23,24}. As their name implies, their diameter of about 8-10 nm is between those of

microfilaments (~7 nm) and microtubules (~25 nm). In addition to this difference in size, IFs are distinguishable from the two other major elements of the cytoskeleton by several characteristics, including tissue-specific expression, developmental regulation, subcellular localization and polymerization dynamics ^{23,24}. In higher vertebrates, this family of proteins comprises more than 70 members classified into 6 groups based on the cell type in which they are expressed. Like neurofilaments, the IFs of neurons, nestin belongs to the type IV subclass, which also includes α -internexin and synemin ²³. Even if all IF proteins share a similar structure, consisting of a central coiled-coil rod domain flanked by N- and C-terminal domains, nestin is unique among its family members in having a very short N-terminal head of 7 amino acids, which prevents filament formation by itself, and a long C-terminal tail presumably involved in mediating interactions with microfilaments and microtubules ^{40,41}. Due to its incapacity to form homodimers, nestin assembles into heterodimers and heterotetramers with other IF proteins, particularly vimentin and α -internexin ^{42,43}. As evidenced by previous studies done in rat ST15A neuronal cells, nestin is constitutively phosphorylated at low levels on a highly conserved threonine residue (Thr-316), which is adjacent to the central rod domain. During mitosis, this residue becomes phosphorylated at a higher level by the mitotic cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1, also known as cdc2), correlating with partial disassembly of nestin filaments ⁴⁴. Interestingly, Thr-316 was also identified as a target site of phosphorylation by Cdk5, a crucial regulator of neuronal development ⁴⁵. Increased phosphorylation at this site in ST15A cells transiently co-transfected with Cdk5 and its activator p35 is associated with nestin reorganization ⁴⁶, thereby suggesting that Thr-316 phosphorylation acts as a molecular switch to control nestin filament dynamics. A role for this residue in regulating cell proliferation was also proposed because its mutation to a non-phosphorylatable alanine reduces the proliferation rate of human pancreatic carcinoma MIA PaCa-2 cells ⁴⁷. Based on phosphoproteomic studies conducted in different model systems, nestin was shown to have many other potential phosphorylation sites in its sequence. For instance, in adult mouse central nervous system progenitor cells, eleven significant phosphorylation sites were identified mostly in the C-terminal tail of nestin ³⁴. Given the suspected role of this domain in protein-protein interactions

^{40,41}, it is possible that either of these phosphorylation sites could contribute to the regulation and functions of nestin.

In this study, we provide evidence using mass spectrometry-based methods that phosphorylation of Ser-894 and Ser-1837 in the C-terminal domain of nestin was substantially reduced upon knockdown of DLK in Neuro-2a cells, indicating a role for DLK in nestin phosphorylation. These two serine residues are of particular interest since they both immediately precede a proline, the typical consensus motif for phosphorylation by proline-directed kinases ⁴⁸. Such kinases, which include CDKs, JNK and glycogen synthase kinases, play essential roles in various cellular functions, like proliferation, differentiation and death, as a result of their ability to phosphorylate key proteins involved in these processes ⁴⁸. Although the identity of the kinase(s) directly responsible for nestin phosphorylation in our model system remains unknown, it is noteworthy to mention that Ser-1837 was identified as a putative Cdk5-dependent phosphorylation site in developing mouse brain using a phosphoproteomics approach³⁵.

Because phosphorylation is known to modulate the function of many proteins by altering their conformation, their interaction ability and/or their stability ⁴⁹, we evaluated its impact on nestin through expression of phosphodeficient and phosphomimetic mutants at Ser-894 and Ser-1837 in Neuro-2a cells. Unlike all other constructs, which showed similar protein abundance, the double phosphomimetic (S894D/S1837D) nestin mutant was consistently present at lower levels in transfected cells. Although surprising at first, since no significant difference in nestin mRNA levels was observed between the constructs, this observation is not without precedent as other studies have previously suggested that the phosphorylation state of nestin is linked to its degradation ^{50,51}. Further support for this idea was recently provided by transfection experiments in HEK293 cells showing that the phosphomimetic nestin mutant T316D is less stable than wild-type nestin or its phospho-dead (T316A) mutant derivative ⁵². In the light of these data and our own results, it is plausible that the DLK-dependent phosphorylation of Ser-894 and Ser-1837 confers some instability to nestin. This instability may be of physiological importance during

cell differentiation to lower nestin levels before replacement by other IFs, such as neurofilaments in neurons ²³. Consistent with the idea that nestin accumulation could interfere with differentiation, overexpression of a stabilized truncated form of nestin in undifferentiated C2C12 myoblasts completely inhibits their conversion to differentiated myotubes ⁵³. Moreover, our observations that expression of the double phosphodeficient (S894A/S1837A) mutant in Neuro-2a cells, but not wild-type or double phosphomimetic (S894D/S1837D) nestin, significantly impaired RA-induced neurite outgrowth suggest that phosphorylation may have relevance for nestin function in cell differentiation.

Despite the fact that nestin has been identified more than 30 years ago ⁵⁴, its physiological function in cells of neural origin is still unknown. During development and regeneration of the nervous system, nestin is predominantly expressed in NPCs from which neuronal and glial cell types arise ³⁹. After commitment of NPCs to either of these lineages, nestin expression declines and is replaced by neurofilaments and glial fibrillary acidic protein in neurons and glial cells, respectively ^{55,56}. At present, it remains largely unclear whether this down-regulation of nestin abundance plays an active role in the switch from growth to differentiation of neural cells. A possible hint into that direction came from the observation that the knockdown of nestin in cultured mouse NPCs induces cell cycle arrest and an increase in the number of cells positive for the neuron-specific marker β III-tubulin ⁵⁷. Additionally, in a very recent study using a combination of antibodies, siRNAs and blocking peptides to nestin, it has been demonstrated that this protein is transiently expressed in the axons of mouse embryonic cortical neurons, both *in vitro* and *in vivo*, and that its depletion by RNA interference leads to larger growth cones and lowered sensitivity to the axonal repellent semaphorin 3A (Sema3A) ⁵⁸. These results thus provide evidence that nestin has a regulatory role in growth cone morphology by acting, at least in part, through the Sema3A signaling pathway, which is known to cause growth cone collapse upon activation ⁵⁹. Because growth cones fulfill several important functions in developing neurons, including axon formation and guidance ⁶⁰, it is tempting to speculate that the decrease in nestin expression observed during differentiation affects their cytoskeletal dynamics in a way that stimulates extension of neuronal processes. Our results showing that depletion of nestin in

Neuro-2a cells promotes neurite outgrowth in the absence of any differentiation stimuli support this idea. The phenotype observed in Neuro-2a cells after nestin depletion identifies for the first time nestin as a potential negative regulator of neurite outgrowth, which is a major hallmark of differentiated cells. This role is reminiscent of what was previously described for nestin in C2C12 and mouse primary myoblasts, where it was found to negatively regulate alignment and elongation of differentiating cells ⁵³. Taken together with our results, this underscores the importance of nestin in differentiation of at least some cell culture models, particularly those of the neuronal and myogenic lineages. Although we have yet to determine how nestin antagonizes neurite formation in Neuro-2a cells, we propose that Cdk5 is a likely candidate effector for two major reasons. First, Cdk5 has been identified as a promoter of neurite outgrowth in differentiating neurons ⁶¹. Second, nestin-mediated sequestration and inactivation of Cdk5 impairs myogenic differentiation of C2C12 myoblasts ⁵³. Thus, it will be of great interest to investigate in future studies whether nestin and Cdk5 act cooperatively to control neurite outgrowth in Neuro-2a cells. Another important question which should be addressed subsequently is to determine what effect, if any, DLK signaling has on Cdk5 activity and function.

In summary, our phosphoproteomic analysis has led to the identification of several proteins that demonstrate DLK-dependent phosphorylation in Neuro-2a cells undergoing RA-induced differentiation. One of these potential candidates, nestin, had decreased phosphorylation at Ser-894 and Ser-1837 in response to DLK knockdown. Phosphomimetic mutation of the Ser-894 and Ser-1837 residues in nestin reduced its abundance, suggesting a role for phosphorylation in the regulation of nestin stability. We show that this regulation is likely to have functional relevance to neuronal differentiation, because expression of a double phosphodeficient nestin mutant in Neuro-2a cells prevented, to a significant extent, the formation of neurites induced by exposure of these cells to RA. Finally, direct evidence for the participation of nestin in Neuro-2a differentiation was provided by experiments showing that nestin knockdown alone induced a substantial increase in neurite outgrowth. Given the antagonistic relationship between DLK and nestin in terms of their effects on neurite outgrowth in Neuro-2a cells, these data are

consistent with a model whereby activation of DLK signaling by RA promotes phosphorylation-dependent decrease in nestin stability, which subsequently leads to morphological differentiation.

2.1.7 Materials and methods

Chemicals and antibodies. Sodium vanadate, protease inhibitors and all other common reagents were obtained from Sigma-Aldrich Canada Ltd. (Oakville, Ontario). The polyclonal antiserum used for detection of DLK was described previously⁶². The polyclonal or monoclonal antibodies against phospho-JNK (Thr183/Tyr185, #4668), JNK (#9252), phospho-c-Jun (Ser63, #9261; Ser73, #3270) and c-Jun (#9165) were purchased from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA). The monoclonal antibody against β -actin (#MA1-140) and Nestin (#611658) were from Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA) and BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ), respectively.

Cell culture. Mouse Neuro-2a neuroblastoma cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 % (v/v) fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin. When indicated, cells were differentiated by incubation in DMEM containing 2% bovine serum albumin and 20 μ M retinoic acid (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO) solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) for 24 h or more.

Lentivirus production and generation of stable Neuro-2a cell lines. 293T cells grown in DMEM supplemented with 10% (v/v) FBS and antibiotics were cotransfected with the envelope protein expressing vector pMD2.G and the packaging protein expressing vector psPAX2 (kindly provided by Dr. Didier Trono University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland) and with either the transfer pLKO.1 empty lentiviral vector⁶³ (plasmid 8453, Addgene, Cambridge, MA) or the pLKO.1-based lentiviral mouse DLK shRNA vector (clone TRCN0000022573

[sh73] or clone TRCN0000022569 [sh69], Open Biosystems, Huntsville, AL) using Polyethylenimine Hydrochloride (#24765, PEI MAX, Polysciences Inc., Warrington, PA) at a ratio of 1 µg:3 µl. At 72 h post-transfection, the culture medium containing lentiviruses was harvested, filtered through 0.45-µm filter, and used for infection. Neuro-2a cells, seeded at a density of 0.3×10^6 cells per well in six-well dishes, 0.5×10^6 cells in 60-mm dishes or 2.0×10^6 cells in 100-mm dishes 24 h before, were infected with viral supernatants supplemented with 8 µg/ml polybrene. Two days later, infected cells were treated with puromycin (2 µg/ml) and selected for several days until obtaining a stable pool of resistant cells.

Cell lysate preparation and immunoblotting. Preparation of cell lysates, SDS-PAGE and immunoblotting were carried out as described previously ⁶⁴. Immunoreactive bands were detected by enhanced chemiluminescence (Western Lightning Plus-ECL, PerkinElmer, Inc. Waltham, MA) and quantified using the Image Studio Lite version 5.2 software (LI-COR Biosciences, Lincoln, NB). β -actin levels were used for normalization.

Neurite outgrowth analysis. Neurite outgrowth was quantified using the NeuroTrack software module of the Incucyte® S3 Live-Cell Analysis System (Essen BioScience Inc., Ann Arbor, MI). *Segmentation mode* was set at [Texture], *Min Cell Width (µm)* at [18,000] and *Neurite Sensitivity* at [0,75]. Measurements were conducted on twelve images (4 images, 3 wells) for each replicate of a given condition. Each experiment was performed in triplicate and the resulting data were subjected to simple linear regression analysis using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). Regressions were considered to be statistically significant if $p < 0.05$.

Quantitative phosphoproteomics. Control (pLKO.1) and sh73/DLK-depleted Neuro-2a cells were incubated in differentiating conditions for 24 h as described above, pelleted and then flash-frozen at -80°C . Samples were submitted to the Proteomics Platform at the CHU de Québec

Research Centre for protein extraction, trypsin digestion, peptide labeling with iTRAQ multiplex reagents (SCIEX, Concord, Ontario) and mass spectrometry analyses, as previously described ⁶⁵. In brief, proteins were extracted in a lysis buffer (50 mM ammonium bicarbonate, 0.5% sodium deoxycholate, 50 mM dithiothreitol) containing protease inhibitors, PhosSTOP phosphatase inhibitor mixture (Roche Diagnostics, Laval, Quebec) and 1 μ M pepstatin. After quantification, 100 μ g of protein per condition from two biological replicates were digested overnight with trypsin followed by labeling with iTRAQ reagent tags 114, 115, 116 and 117 for 2 h at room temperature in the dark as suggested by the manufacturer. Labeled peptides were then combined in one tube, cleaned up using HLB cartridge (Waters, Mississauga, Ontario), subjected to phosphopeptide enrichment on TiO₂ beads and purified on a graphite column (#A32993, High-Select™ TiO₂ Phosphopeptide Enrichment Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The phosphopeptide sample was analyzed by nanoLC-MS/MS using a Dionex UltiMate 3000 (RSLCnano) chromatography system (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) coupled to an Orbitrap Fusion mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) as described ⁶⁶. The mass spectrometry raw files were processed and quantified using Proteome Discoverer 2.1 software (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), and searched against a Uniprot Mus musculus protein database (58,654 entries) using both the Mascot and Sequest algorithms. Identified peptides and proteins were filtered at a false discovery rate of 1 % using the target-decoy strategy. Only proteins identified with at least two unique peptides were considered for quantification. Normalization of mass spectrometry data and peptide ratio calculation were performed by the Proteome Discoverer software. Statistical significance between samples was evaluated using one-way ANOVA analysis and z-score calculation. Phosphopeptides with a p value <0.05 and a z-score >2 were considered differentially expressed.

PRM analysis. The levels of phosphorylation on nestin at sites Ser-894 and Ser-137, and on c-Jun at sites Ser-63 and Ser-73 were monitored in control and DLK-depleted cells from three independent experiments using PRM, a MS/MS-based method for targeted quantitation ³⁶. Phosphopeptide abundance was normalized to cytochrome c peptides previously spiked-in the samples and subsequent quantification were performed using the Skyline software package ⁶⁷.

For comparisons of data between experiments and between samples, statistical analysis was done using unpaired two-tailed *t* test.

qRT-PCR experiments. Total RNA was extracted with the Direct-zol RNA MiniPrep kit (#R2050, Zymo Research, Irvine, CA) in combination with TRIzol (#15596026, Life Technologies, Burlington, Ontario), following the manufacturer's protocol. A 15 min on-column DNase treatment was performed before elution according to manufacturer's instructions. RNA was quantified on a NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Total RNA quality was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA). Reverse transcription was performed on 0.6 – 1.0 µg total RNA with ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis Kit (New England BioLabs, Ipswich, MA). All forward and reverse primers were individually resuspended to 100 µM stock solution in Tris-EDTA buffer (10 mM Tris pH 8.0, 0.1 mM EDTA) and diluted as a primer pair in RNase-DNase-free water to 2.5 µM each. Quantitative PCR (qPCR) reactions were performed on a CFX-96 thermocycler (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario) using SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario). Each primer was used at a concentration of 250 nM. The subsequent cycling conditions were programmed: 3 min at 98 °C; 40 cycles: 15 sec at 98 °C, 30 sec at 60 °C, 15 sec at 72 °C. Relative expression levels were calculated using the qBASE framework ⁶⁸ and the housekeeping genes *Sdha*, *Txn14b* and *Gusb* for mouse cDNA. Primer design and validation was evaluated as described elsewhere ⁶⁹. In every qPCR run, a no-template control was performed for each primer pair and these were consistently negative. All primer sequences are available in Table 2.

Plasmids, mutagenesis and transfection. The expression plasmid for wild-type mouse nestin (#MC202576) was obtained from OriGene (Rockville, MD). Nestin mutants at position Ser-894 (S894D, S894A), Ser-1837 (S1837D, S1837A) and Ser-894/Ser-1837 (S894D/S1837D, S894A/S1837A) were generated using Q5® site-directed mutagenesis kit (#E0554S, New England BioLabs Inc., Ipswich, MA) and the appropriate primers listed in Table 3. The sequence

of each mutant was confirmed by DNA sequencing of the expression vector. Transient transfections of Neuro-2a cells were carried out by using 1 µg of the various nestin expression vectors per ml of growth medium and PEI MAX. Cells were harvested and processed for Western blot or qRT-PCR analyses 48 h after transfection.

RNA interference. RNA interference was achieved transiently using small interfering RNA (siRNA) targeting murine nestin (ON-TARGETplus siRNA SMARTpool, #L-057300-01-0005, Dharmacon, Lafayette, CO) or non-targeting control siRNAs (ON-TARGETplus Non-targeting Control Pool, #D0018101005, Dharmacon, Lafayette, CO) and the Lipofectamine® RNAiMAX transfection reagent (#13778100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The assays were performed as suggested by *Lipofectamine® RNAiMAX Reagent Protocol 2013*. However, Neuro-2a were seeded at concentrations of 0.2×10^6 cells per well of a 6-well plate and 5.0×10^4 cells per well of a 96-well plate.

Statistical analysis. Immunoblot and qRT-PCR data represent the mean \pm SEM of at least three independently performed experiments. The statistical significance between mean values was determined by unpaired t test with Welch's correction (two tails) using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA). A *p* value of < 0.05 was considered statistically significant.

Data Availability: The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Acknowledgments: We thank Dr. Alain Lavigueur for critical reading of the manuscript. This work was made possible by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (2017-05402) and the Université de Sherbrooke.

Author Contributions: GSC and RB designed the study. GSC performed the experiments and analyzed the data. GSC and RB supervised the experiments and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper and is supplied as a single separate file.

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

2.1.8 References

1. Kamiguchi, H. The role of cell adhesion molecules in axon growth and guidance. *Adv. Exp. Med. Biol.* **621**, 95–103 (2007).
2. Polleux, F. & Snider, W. Initiating and growing an axon. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a001925 (2010).
3. Tedeschi, A. Tuning the orchestra: transcriptional pathways controlling axon regeneration. *Front. Mol. Neurosci.* **4**, 1–12 (2012).
4. Gallo, K. A. & Johnson, G. L. Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 663–672 (2002).
5. Coffey, E. T. Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 285–99 (2014).
6. Jin, Y. & Zheng, B. Multitasking: Dual Leucine Zipper-Bearing Kinases in Neuronal Development and Stress Management. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **35**, 501–521 (2019).

7. Hirai, S. *et al.* The c-Jun N-terminal kinase activator dual leucine zipper kinase regulates axon growth and neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J. Neurosci.* **26**, 11992–12002 (2006).
8. Shin, J. E. *et al.* Dual Leucine Zipper Kinase Is Required for Retrograde Injury Signaling and Axonal Regeneration. *Neuron* **74**, 1015–1022 (2012).
9. Watkins, T. A. *et al.* DLK initiates a transcriptional program that couples apoptotic and regenerative responses to axonal injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 4039–44 (2013).
10. Hao, Y. *et al.* An evolutionarily conserved mechanism for cAMP elicited axonal regeneration involves direct activation of the dual leucine zipper kinase DLK. *Elife* **5**, (2016).
11. Miller, B. R. *et al.* A dual leucine kinase-dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. *Nat. Neurosci.* **12**, 387–389 (2009).
12. Pozniak, C. D. *et al.* Dual leucine zipper kinase is required for excitotoxicity-induced neuronal degeneration. *J. Exp. Med.* **210**, 2553–2567 (2013).
13. Watkins, T. A. *et al.* DLK initiates a transcriptional program that couples apoptotic and regenerative responses to axonal injury. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 4039–4044 (2013).
14. Welsbie, D. S. *et al.* Functional genomic screening identifies dual leucine zipper kinase as a key mediator of retinal ganglion cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, (2013).
15. Le Pichon, C. E. *et al.* Loss of dual leucine zipper kinase signaling is protective in animal models of neurodegenerative disease. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaag0394 (2017).
16. Eto, K., Kawauchi, T., Osawa, M., Tabata, H. & Nakajima, K. Role of dual leucine zipper-bearing kinase (DLK/MUK/ZPK) in axonal growth. *Neurosci. Res.* **66**, 37–45 (2010).
17. Gdalyahu, A. *et al.* DCX, a new mediator of the JNK pathway. *EMBO J.* **23**, 823–832 (2004).

18. Dehmelt, L., Smart, F. M., Ozer, R. S. & Halpain, S. The role of microtubule-associated protein 2c in the reorganization of microtubules and lamellipodia during neurite initiation. *J. Neurosci.* **23**, 9479–90 (2003).
19. Teng, J. *et al.* Synergistic effects of MAP2 and MAP1B knockout in neuronal migration, dendritic outgrowth, and microtubule organization. *J. Cell Biol.* **155**, 65–76 (2001).
20. Raivich, G. c-Jun Expression, activation and function in neural cell death, inflammation and repair. *J. Neurochem.* **107**, 898–906 (2008).
21. Bareyre, F. M. *et al.* In vivo imaging reveals a phase-specific role of STAT3 during central and peripheral nervous system axon regeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 6282–7 (2011).
22. Blondeau, A. *et al.* Dual leucine zipper kinase regulates expression of axon guidance genes in mouse neuronal cells. *Neural Dev.* **11**, 13 (2016).
23. Lowery, J., Kuczmarski, E. R., Herrmann, H. & Goldman, R. D. Intermediate Filaments Play a Pivotal Role in Regulating Cell Architecture and Function. *J. Biol. Chem.* **290**, 17145–53 (2015).
24. Sharma, P., Alsharif, S., Fallatah, A. & Chung, B. M. Intermediate Filaments as Effectors of Cancer Development and Metastasis: A Focus on Keratins, Vimentin, and Nestin. *Cells* **8**, 497 (2019).
25. Miller, B. R. *et al.* A dual leucine kinase-dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. *Nat. Neurosci.* **12**, 387–389 (2009).
26. Hammarlund, M., Nix, P., Hauth, L., Jorgensen, E. M. & Bastiani, M. Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. *Science* **323**, 802–6 (2009).
27. Angel, P., Hattori, K., Smeal, T. & Karin, M. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* **55**, 875–885 (1988).
28. Hirai, S. S. -i., Banba, Y., Satake, T. & Ohno, S. Axon Formation in Neocortical Neurons Depends on Stage-Specific Regulation of Microtubule Stability by the Dual Leucine Zipper Kinase-c-Jun N-Terminal Kinase Pathway. *J. Neurosci.* **31**, 6468–6480 (2011).

29. Barnat, M. *et al.* Distinct Roles of c-Jun N-Terminal Kinase Isoforms in Neurite Initiation and Elongation during Axonal Regeneration. *J. Neurosci.* **30**, 7804–7816 (2010).
30. Danzi, M. C. *et al.* The effect of Jun dimerization on neurite outgrowth and motif binding. *Mol. Cell. Neurosci.* **92**, 114–127 (2018).
31. Raivich, G. *et al.* The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* **43**, 57–67 (2004).
32. Pollscheit, J., Glaubitz, N., Haller, H., Horstkorte, R. & Bork, K. Phosphorylation of serine 774 of the neural cell adhesion molecule is necessary for cyclic adenosine monophosphate response element binding protein activation and neurite outgrowth. *J. Neurosci. Res.* **90**, 1577–1582 (2012).
33. Wu, X. *et al.* Investigation of Receptor interacting protein (RIP3)-dependent Protein Phosphorylation by Quantitative Phosphoproteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **11**, 1640–1651 (2012).
34. Namiki, J., Suzuki, S., Masuda, T., Ishihama, Y. & Okano, H. Nestin protein is phosphorylated in adult neural stem/progenitor cells and not endothelial progenitor cells. *Stem Cells Int.* **2012**, 430138 (2012).
35. Contreras-Vallejos, E. *et al.* Searching for Novel Cdk5 Substrates in Brain by Comparative Phosphoproteomics of Wild Type and Cdk5^{-/-} Mice. *PLoS One* **9**, e90363 (2014).
36. Rauniyar, N. Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 28566–81 (2015).
37. Gilyarov, A. V. Nestin in central nervous system cells. *Neurosci. Behav. Physiol.* **38**, 165–169 (2008).
38. Xiong, X. *et al.* Protein turnover of the Wallenda/DLK kinase regulates a retrograde response to axonal injury. *J. Cell Biol.* **191**, 211–223 (2010).
39. Bernal, A. & Arranz, L. Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and

therapeutic implications. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 2177–2195 (2018).

40. Hirokawa, N., Glicksman, M. A. & Willard, M. B. Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **98**, 1523–1536 (1984).
41. Hisanaga, S. & Hirokawa, N. Structure of the peripheral domains of neurofilaments revealed by low angle rotary shadowing. *J. Mol. Biol.* **202**, 297–305 (1988).
42. Eliasson, C. *et al.* Intermediate Filament Protein Partnership in Astrocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 23996–24006 (1999).
43. Marvin, M. J., Dahlstrand, J., Lendahl, U. & McKay, R. D. A rod end deletion in the intermediate filament protein nestin alters its subcellular localization in neuroepithelial cells of transgenic mice. *J. Cell Sci.* **111** (Pt 14), 1951–61 (1998).
44. Sahlgren, C. M. *et al.* Mitotic reorganization of the intermediate filament protein nestin involves phosphorylation by cdc2 kinase. *J. Biol. Chem.* **276**, 16456–63 (2001).
45. Zhu, J., Li, W. & Mao, Z. Cdk5: mediator of neuronal development, death and the response to DNA damage. *Mech. Ageing Dev.* **132**, 389–94 (2011).
46. Sahlgren, C. M. *et al.* Cdk5 Regulates the Organization of Nestin and Its Association with p35. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5090–5106 (2003).
47. Matsuda, Y. *et al.* Nestin phosphorylation at threonines 315 and 1299 correlates with proliferation and metastasis of human pancreatic cancer. *Cancer Sci.* **108**, 354–361 (2017).
48. Lu, K. P., Liou, Y. C. & Zhou, X. Z. Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. *Trends Cell Biol.* **12**, 164–72 (2002).
49. Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G. & Lo Muzio, L. The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int. J. Mol. Med.* **40**, 271–280 (2017).

50. Yang, J. *et al.* Nestin negatively regulates postsynaptic differentiation of the neuromuscular synapse. *Nat. Neurosci.* **14**, 324–30 (2011).
51. Sahlgren, C. M. *et al.* A nestin scaffold links Cdk5/p35 signaling to oxidant-induced cell death. *EMBO J.* **25**, 4808–19 (2006).
52. Bott, C. J. *et al.* A novel signaling role for nestin in regulating growth cone morphology via the cdk5 substrate DCX. *bioRxiv* 695155 (2019) doi:10.1101/695155.
53. Pallari, H.-M. *et al.* Nestin as a regulator of Cdk5 in differentiating myoblasts. *Mol. Biol. Cell* **22**, 1539–1549 (2011).
54. Hockfield, S. & McKay, R. D. Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.* **5**, 3310–28 (1985).
55. Lothian, C. & Lendahl, U. An Evolutionarily Conserved Region in the Second Intron of the Human Nestin Gene Directs Gene Expression to CNS Progenitor Cells and to Early Neural Crest Cells. *Eur. J. Neurosci.* **9**, 452–462 (1997).
56. Zimmerman, L. *et al.* Independent regulatory elements in the nestin gene direct transgene expression to neural stem cells or muscle precursors. *Neuron* **12**, 11–24 (1994).
57. Hu, W. *et al.* Suppression of Nestin reveals a critical role for p38-EGFR pathway in neural progenitor cell proliferation. *Oncotarget* **7**, 87052–87063 (2016).
58. Bott, C. J. *et al.* Nestin in immature embryonic neurons affects axon growth cone morphology and Semaphorin3a sensitivity. *Mol. Biol. Cell* **30**, 1214–1229 (2019).
59. Tang, B. Semaphorin 3A: from growth cone repellent to promoter of neuronal regeneration. *Neural Regen. Res.* **13**, 795 (2018).
60. Dent, E. W., Gupton, S. L. & Gertler, F. B. The growth cone cytoskeleton in axon outgrowth and guidance. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a001800–a001800 (2011).
61. Nikolic, M., Dudek, H., Kwon, Y. T., Ramos, Y. F. & Tsai, L. H. The cdk5/p35 kinase is essential for neurite outgrowth during neuronal differentiation. *Genes Dev.* **10**, 816–

825 (1996).

62. Douziech, M., Laberge, G., Grondin, G., Daigle, N. & Blouin, R. Localization of the mixed-lineage kinase DLK/MUK/ZPK to the Golgi apparatus in NIH 3T3 cells. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 1287–1296 (1999).
63. Stewart, S. A. *et al.* Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA* **9**, 493–501 (2003).
64. Daviau, A., Couture, J.-P. J. P. & Blouin, R. Loss of DLK expression in WI-38 human diploid fibroblasts induces a senescent-like proliferation arrest. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **413**, 282–7 (2011).
65. Bourassa, S. *et al.* Evaluation of iTRAQ and SWATH-MS for the quantification of proteins associated with insulin resistance in human duodenal biopsy samples. *PLoS One* **10**, e0125934 (2015).
66. Sheta, R. *et al.* A metabolic labeling approach for glycoproteomic analysis reveals altered glycoprotein expression upon GALNT3 knockdown in ovarian cancer cells. *J. Proteomics* **145**, 91–102 (2016).
67. Pino, L. K. *et al.* The Skyline ecosystem: Informatics for quantitative mass spectrometry proteomics. *Mass Spectrom. Rev.* (2017) doi:10.1002/mas.21540.
68. Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F. & Vandesompele, J. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol.* **8**, R19 (2007).
69. Brosseau, J.-P. *et al.* High-throughput quantification of splicing isoforms. *RNA* **16**, 442–9 (2010).

2.1.9 Informations supplémentaires article

Quantitative phosphoproteomics identifies nestin as a potential mediator of DLK-dependent neurite outgrowth

Guillaume St-Cyr¹ and Richard Blouin¹

¹Département de biologie, Faculté des sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

Supplementary Information

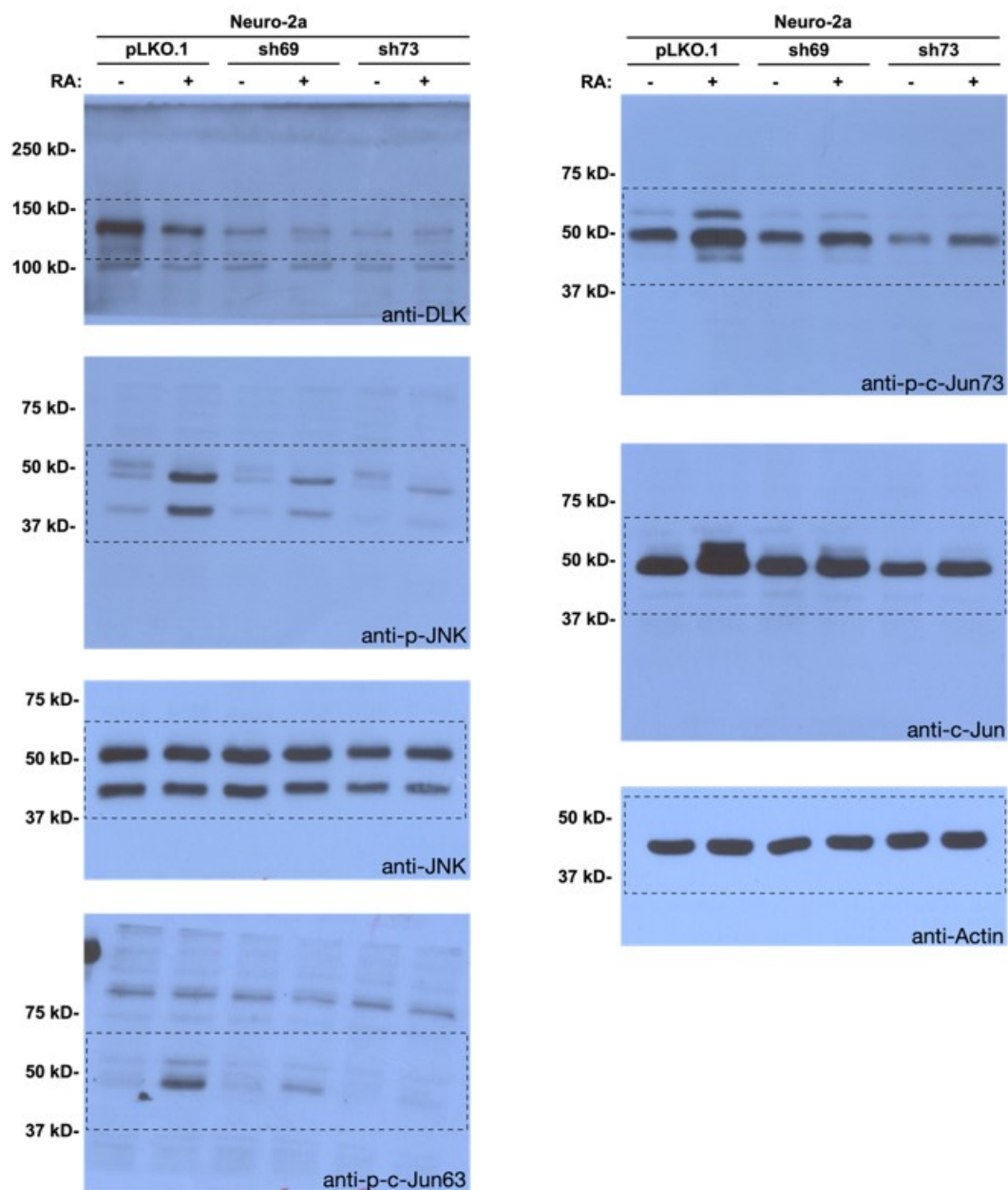


Figure 18. Original images of the western blot data shown in Fig. 12a. The cropped area is shown in inset.

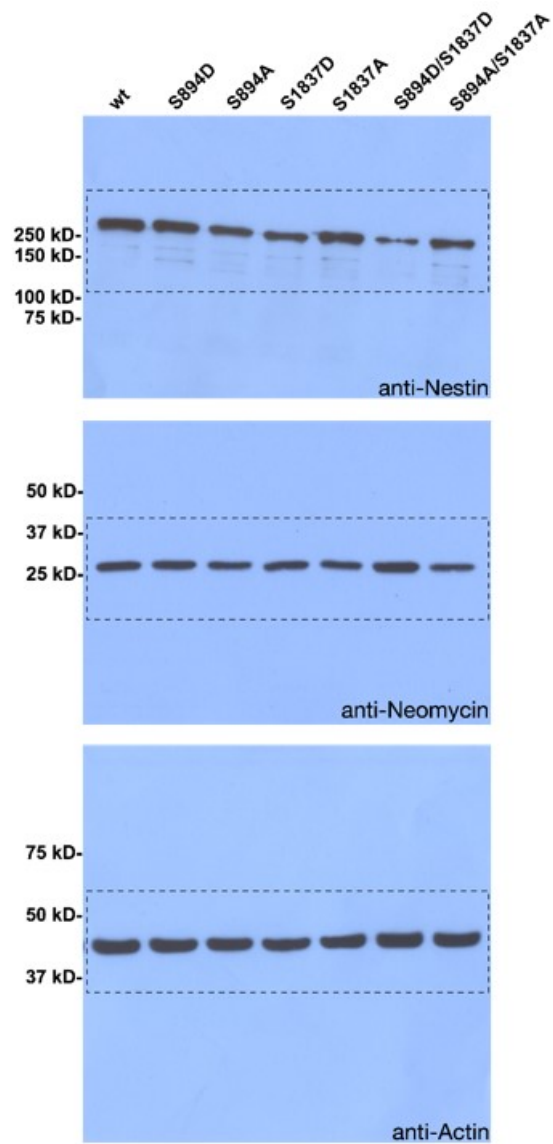


Figure 19. Original images of the western blot data shown in Fig. 15a. The cropped area is shown in inset.

Table 2. List of primers used for real time quantitative PCR.

Target	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
Nestin	TACTCCCTTGGGCCTCTACC	TCTTCCTCTGGTGGGTCACT
Nestin-M13	CCAGAGGAGCAGCAATGATG	CAGGAAACAGCTATGACCGC
Neomycin	TGCCTGCTTGCCGAATATCA	ATATCACGGGTAGCCAACGC
Sdha	CGGCTTTCACTTCTCTGTTGGTGA	AAAGGCCAAATGCAGCTCGCAA
Txn14b	CCCTCTACCGTATTTTTCTTCAATGGGC	AGTTTTCCCCTCATCGCTCCCC
Gusb	TCTGAAACCCGCCGCATATT	CGTTGCTCACAAAGGTCACG

Table 3. List of primers used for mutagenesis of nestin.

Name	Forward primer (5' to 3')	Reverse primer (5' to 3')
S894D	GAATGTGCAG gat CCAAGGTATCTG	TCTTTTTTCGAGAGATTCTG
S894A	GAATGTGCAG gca CCAAGGTATC	TCTTTTTTCGAGAGATTCTGAGG
S1837D	TTTAGTAGGG gat CCTGTGCATCTAGGCCC	GGGGCCTTGAGGGTACCC
S1837A	TTTAGTAGGG gca CCTGTGCATCTAGG	GGGGCCTTGAGGGTACCC

CHAPITRE 3

DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

Il était question, lors de mon projet, de chercher à mieux comprendre les mécanismes par lesquels DLK régule la formation et la croissance des neurites. Bien que l'importance de DLK dans le développement des projections neuronales soit établie, les éléments moléculaires qui sous-entendent ce développement ne sont pas tous connus. L'objectif était, donc, d'identifier de nouveaux effecteurs de DLK, en supposant qu'ils influenceraient la morphologie ou l'organisation du cytosquelette.

Un nouvel effecteur de DLK, la nestine, a été révélé grâce à l'analyse du phosphoprotéome de cellules neuronales murines en différenciation. Ainsi, deux sites de phosphorylation sous-régulés en absence de DLK ont été identifiés : la sérine 1837 (''APLVGSPVHLGPSQPLK'') et la sérine 894 (''VSGVSLESLEKENVQSPR''). La nestine contient 1864 acides aminés (PubMed : NP_057910.3). Elle est caractérisée par un domaine N-terminal très court favorisant la formation d'hétéro- dimère/tétramère et un domaine C-terminal particulièrement long (>1400 aa) permettant les interactions avec d'autres composantes du cytosquelette (Bernal et Arranz, 2018). Les deux sites de phosphorylation mis en évidence par l'analyse se situent dans la portion C-terminale. Cependant, considérant la longueur du domaine C-terminal, les deux sites pourraient être éloignés l'un de l'autre et remplir, individuellement, des fonctions différentes. Les données récoltées suggèrent que la phosphorylation de la nestine à ces deux endroits diminue sa stabilité et, de cette façon, l'inhibe. La réduction des niveaux de nestine serait, donc, nécessaire au développement adéquat des neurites.

La persistance de l'expression de la nestine au stade de développement neuronal post-mitotique a été abordée dans le chapitre d'introduction de ce manuscrit. Il a été démontré que la nestine

augmente la sensibilité à la sémaphorine 3a, une molécule chimio-répulsive qui induit la rétraction des filopodes, une structure riche en actine, et l'effondrement des cônes de croissance de telle sorte que la déplétion de la nestine des neurones immatures de culture primaire conduit à un développement anormal des cônes de croissance et à la réduction de leur sensibilité à la sémaphorine 3a (Bott et al., 2019a). En d'autres mots, la nestine contrerait les efforts neuritogéniques du neurone. DLK favoriserait, ainsi, le maintien du cône de croissance et l'élongation du neurite, entre autres, en réduisant les niveaux de nestine et en empêchant celle-ci de s'opposer au développement du neurite. Dans les cellules Neuro-2a en prolifération, la déplétion de la nestine conduit à la formation et, plus faiblement, la croissance des neurites. Dans ce cas, l'induction de la neuritogenèse pourrait être la conséquence d'une déstabilisation du cytosquelette, une étape importante de la neuritogenèse, causée par la perte d'une composante du cytosquelette de filaments intermédiaires, la nestine. Une fois les neurites formés, l'absence de la nestine dans les cônes de croissance faciliterait leur élongation puisqu'elle diminuerait l'efficacité d'un mécanisme servant à la contrer. L'effet inhibiteur que possède la nestine sur la neuritogenèse pourrait aussi favoriser le maintien des NPCs dans un état non-différencié, considérant l'expression élevée de nestine à ce stade de développement. Par la suite, l'activation de DLK lors de la différenciation réduirait localement, dans les cônes de croissance, l'expression de la nestine afin de favoriser l'élongation des neurites et, suivant l'amplification de l'activation de DLK, plus généralement à travers le neurone afin de contribuer au remplacement de la nestine par les neurofilaments.

Afin de clarifier la voie de signalisation qui unie DLK et la nestine, il est nécessaire de s'interroger au sujet de l'identité de la kinase qui phosphoryle la nestine aux sérines 894 et 1837. En observant les peptides mentionnés ci-haut séquencés par l'analyse de phosphoprotéomique, on constate que les sérines phosphorylées se retrouvent en aval d'un résidu proline. Il existe justement une classe de protéines kinases, les 'proline-directed serine/threonine kinase', qui cible préférentiellement les sérines et thréonines précédant une proline. Parmi ces kinases, il y a la kinase dépendante des cyclines 5 (CDK5) (Malumbres, 2014). Dans les myoblastes, CDK5 et son activateur p35 sont régulés par leur protéine échafaud, la nestine. Elle séquestre le

complexe CDK5 – p35, inhibe leur activité et empêche le clivage de p35 en p25, une forme stabilisée de l'activateur de CDK5. Par ce mécanisme, la nestine freine la différenciation puisque l'activité du complexe CDK5 – p25 est critique au processus de différenciation (Pallari et al., 2011). L'interaction de la nestine, p35 et CDK5 semble être régulée par ce dernier. En effet, la phosphorylation de la nestine à la thréonine 316 par CDK5 permet la dissociation de p35 et l'activation de CDK5 (Sahlgren et al., 2003). CDK5 est également nécessaire à la différenciation des neurones (Cicero et Herrup, 2005; Shah et Lahiri, 2014; Kawauchi, 2014). Il se pourrait, alors, que le même mécanisme soit présent dans ce type cellulaire et implique la nestine de façon similaire. DLK stimulerait l'activité de CDK5 – p25 et, ainsi, la différenciation neuronale en régulant la phosphorylation de la nestine et son inhibition. JNK phosphoryle un grand nombre de protéines impliquées dans la régulation de l'organisation du cytosquelette. Puisque la nestine semble faire partie de ce type de protéines, il serait intéressant de vérifier si l'absence de JNK conduit également à la réduction du niveau de phosphorylation de la nestine aux sérines 894 et 1837. Récemment, il a été démontré que la nestine lie DCX, un substrat de JNK, et facilite sa phosphorylation par CDK5 afin de réguler la morphologie du cône de croissance (Bott et al., 2019b). L'axe de signalisation DLK – JNK et le complexe nestine – CDK5 – p35/p25 sont à proximité l'un de l'autre à un certain moment suggérant, ainsi, de possibles interactions.

D'autres effecteurs potentiels de DLK dans la neuritogenèse ont été identifiés par l'analyse du phosphoprotéome et pourraient être caractérisés de manière plus exhaustive. Ncam1 ('neural cell adhesion molecule 1') est nécessaire à la croissance axonale et dendritique ainsi qu'à leur ramification (Frese et al., 2017). Elle est également impliquée dans le guidage axonal, un processus couplé à la croissance axonale lors de différenciation des neurones (Enriquez-Barreto et al., 2012). Les interactions cellules – cellules sont aussi régulées par cette protéine (Rutishauser et al., 1988). Moléculairement, Ncam1 est une protéine transmembranaire membre des molécules adhésives de la superfamille des immunoglobulines. Sa portion extracellulaire est composée de cinq domaines immunoglobulines et deux domaines 'fibronectin-like' de type III (Westphal et al., 2010). Son domaine cytoplasmique, quant à lui,

lie le cytosquelette d'actine en interagissant directement avec la spectrine, un intégrateur cytosquelettique qui permet la liaison du cytosquelette à la membrane (Schmid et Maness, 2008; Liem, 2016). En plus de s'associer avec lui-même, Ncam1 peut être le co-récepteur des intégrines et du GNDF ('glial cell line-derived neurotrophic factor') (Liem, 2016). L'interaction entre ce dernier et NCAM induit la différenciation des neurones de l'hippocampe (Nielsen et al., 2009). Les intégrines, quant à elles, lient une composante majeure de la matrice extracellulaire (ECM), les laminines et stimulent ainsi la croissance des neurites (Plantman et al., 2008). De plus, tout comme Ncam1, les intégrines sont liées au cytosquelette d'actine avec une affinité qui varie selon le contexte (Vincente-Manzanares et al., 2009). Ensemble, ces informations exposent l'importance de Ncam1 dans le développement et la régénération des axones. Ainsi, dans le cadre d'un projet futur, il serait intéressant de caractériser le rôle de la phosphorylation de Ncam1 dans le développement des neurones, d'investiguer les événements extracellulaires qui activent DLK et de chercher à comprendre comment DLK régule ou est régulé par les interactions cellules – cellules et cellules – ECM.

Marcks11 ('myristoylated alanine-rich C-kinase substrate' (Marcks)-like protein 1') a été identifié dans les phosphopeptides sous- et sur-régulés, ce qui est particulièrement intrigant et suggère qu'en absence de DLK, certains résidus sont plus phosphorylés alors que certains autres le sont moins. Dans ce cas, peut-être que DLK régule une phosphatase qui cible Marcks11. Cette dernière régule le regroupement et la stabilisation de l'actine F, augmente le nombre et la dynamique des filopodes et réduit la migration des neurones. Marcks11 est, ainsi, un important régulateur de la motilité. L'actine joue un rôle dominant durant la migration neuronale et les mécanismes moléculaires qui régule son organisation ont été présentés dans le chapitre d'introduction. Le cône de croissance, une structure où l'on retrouve un enrichissement de DLK, est principalement formé d'actine. La caractérisation de cet effecteur potentiel offrirait, donc, la possibilité de mieux comprendre comment DLK régule le cytosquelette d'actine et, par le fait même, le cône de croissance. Il serait, alors, important de connaître l'impact de la phosphorylation médiée par DLK sur l'activité de la protéine et la façon dont ce changement d'activité influence la migration des neurones.

Deux phosphopeptides provenant de l'histone H1 ont également été identifiés lors de l'analyse. L'histone h1 participe à la formation de l'hétérochromatine et est, ainsi, associée à la répression de gènes (Hergeth et Schneider, 2015). On peut supposer que la phosphorylation de l'histone H1 favorise la condensation de la chromatine et que celle-ci est nécessaire à la différenciation des neurones autant qu'à la différenciation des cellules souches hématopoïétiques (Ugarte et al., 2015). Dans ce cas, les neurones déplétés de DLK aux histones H1 hypo-phosphorylées exprimeraient des gènes incompatibles avec la formation des neurites et la différenciation neuronale. Il serait, alors, judicieux d'identifier ces gènes afin de mieux comprendre le rôle de DLK dans la différenciation des neurones. Une expérience de complémentation par l'expression d'histone h1 phospho-mimétique pourrait même, du moins en partie, secourir le phénotype déficient.

La formation des neurites est une étape importante de la neurogenèse. C'est un processus qui est, en quelque sorte, recyclé lors de la régénération des axones endommagés, particulièrement ceux du système nerveux périphérique. L'étude des mécanismes moléculaires qui soutiennent ladite formation des neurites sert, ainsi, deux causes. DLK remplit plusieurs importantes fonctions dans le développement des neurones. Il est nécessaire à la croissance axonale, la migration neuronale et la polarisation des neurones. Cependant, DLK est également impliqué dans la régénération axonale (Tedeschi et Bradke, 2013).

Après une blessure, les axones du système nerveux périphérique ont la capacité de se régénérer. Un programme régénératif est rapidement mis en place, afin de réparer le neurone endommagé, grâce à un influx de calcium causé par la blessure. Cette augmentation intracellulaire de calcium active les éléments cellulaires nécessaires à la réparation de l'axone. La réorganisation de cytosquelette et la régénération subséquente du cône de croissance marqueront le début de la régénération de l'axone (Curcio et Bradke, 2018). Une réponse plus tardive à la blessure est également présente. Dans ce cas, les protéines motrices transportent des molécules de signalisation vers le corps cellulaire (Mahar et Cavalli, 2018). Ce transport rétrograde requiert

DLK. Ce dernier est aussi nécessaire à la régulation transcriptionnelle et à l'expression de gènes activés en réponse à une blessure. Par exemple, le facteur de transcription STAT3 est phosphorylé au site de la blessure et transporté vers le corps cellulaire. De la même façon que c-Jun, p-STAT3 promeut la régénération axonale. Bref, DLK est nécessaire à la régénération des axones (Shin et al., 2012, Shin et al., 2019).

En principe, la nestine n'est plus exprimé dans les neurones adultes alors le mécanisme nouvellement exposé dans l'article précédent ne devrait pas être sollicité. Cependant, la nestine régule la morphologie du cône de croissance (Bott et al., 2019a, 2019b). Elle est, donc, peut-être nécessaire à sa construction optimale et exprimée à la suite d'une atteinte à l'axone. Il pourrait être intéressant d'observer, en temps réel, la dynamique du cytosquelette et le réarrangement induit par le déclenchement du programme de régénération axonal. Il serait également pertinent de visualiser l'activation de DLK par l'influx de calcium généré par la blessure. L'importante augmentation cytosolique de calcium pourrait faciliter l'observation et la détection des mécanismes calcium-dépendants qui activent DLK.

En résumé, ce projet aura permis d'identifier un nouveau mécanisme permettant à DLK de réguler la neuritogenèse. Ainsi, la réduction du niveau d'expression de la nestine serait nécessaire à la différenciation des neurones. La poursuite de ce projet en culture primaire pourrait offrir plusieurs opportunités. La structure du cytosquelette durant l'initiation de la différenciation des neurones pourrait, en effet, être proprement étudiée. Il serait intéressant de localiser la nestine à l'événement de déstabilisation du cytosquelette précédant le bourgeonnement du neurite, d'impliquer la nestine dans ce mécanisme et d'intégrer les autres composantes du cytosquelette en identifiant les partenaires d'interaction de la nestine avant et après le bourgeonnement du neurite. Les réponses à ces questions permettraient de décortiquer de façon précise les mécanismes qui sous-entendent l'induction de la neuritogenèse et de mieux comprendre le rôle de la nestine. Il serait également important de confirmer les résultats obtenus dans l'article en modifiant la nestine endogène plutôt qu'en surexprimant des versions mutantes

de celle-ci. On pourrait, ainsi, observer des changements plus physiologiques. Il est fortement probable que les cellules exprimant la nestine S894A/S1837A aient beaucoup plus de difficultés à former des neurites.

BIBLIOGRAPHIE

Bernal, A, and Arranz, L (2018). Nestin-expressing progenitor cells: function, identity and therapeutic implications. *Cell Mol Life Sci* 75, 2177–2195.

Björkblom, B et al. (2012). c-Jun N-terminal kinase phosphorylation of MARCKSL1 determines actin stability and migration in neurons and in cancer cells. *Mol Cell Biol* 32, 3513–3526.

Blanco, V, Camelo, JL, and Carri, NG (2001). Growth inhibition, morphological differentiation and stimulation of survival in neuronal cell type (Neuro-2a) treated with trophic molecules. *Cell Biology International* 25, 909–917.

Blouin, R (2016). DLK (Dual Leucine Zipper-Bearing Kinase). In: *Encyclopedia of Signaling Molecules*, ed. S Choi, New York, NY: Springer New York, 1–6.

Blouin, R, Beaudoin, J, Bergeron, P, Nadeau, A, and Grondin, G (1996). Cell-specific expression of the ZPK gene in adult mouse tissues. *DNA Cell Biol* 15, 631–642.

Bogoyevitch, MA, and Kobe, B (2006). Uses for JNK: the Many and Varied Substrates of the c-Jun N-Terminal Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 1061–1095.

Bond, AM, Ming, G-L, and Song, H (2015). Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell* 17, 385–395.

Bott, CJ, Johnson, CG, Yap, CC, Dwyer, ND, Litwa, KA, and Winckler, B (2019a). Nestin in immature embryonic neurons affects axon growth cone morphology and Semaphorin3a sensitivity. *Mol Biol Cell* 30, 1214–1229.

Bott, CJ, Keil, JM, McMahon, LP, Yap, CC, Kwan, KY, and Winckler, B (2019b). A novel signaling role for nestin in regulating growth cone morphology via the cdk5 substrate DCX. *BioRxiv*, 695155.

Bouquet, C, Soares, S, von Boxberg, Y, Ravaille-Veron, M, Propst, F, and Nothias, F (2004). Microtubule-associated protein 1B controls directionality of growth cone migration and axonal branching in regeneration of adult dorsal root ganglia neurons. *J Neurosci* 24, 7204–7213.

Chang, L, Jones, Y, Ellisman, MH, Goldstein, LSB, and Karin, M (2003). JNK1 is required for maintenance of neuronal microtubules and controls phosphorylation of microtubule-associated proteins. *Dev Cell* 4, 521–533.

Chavali, M, Klingener, M, Kokkosis, AG, Garkun, Y, Felong, S, Maffei, A, and Aguirre, A (2018). Non-canonical Wnt signaling regulates neural stem cell quiescence during homeostasis and after demyelination. *Nat Commun* 9.

Chen, K, Ye, Y, Ji, Z, Tan, M, Li, S, Zhang, J, Guo, G, and Lin, H (2014). Katanin p60 promotes neurite growth and collateral formation in the hippocampus. *Int J Clin Exp Med* 7, 2463–2470.

Cicero, S, and Herrup, K (2005). Cyclin-dependent kinase 5 is essential for neuronal cell cycle arrest and differentiation. *J Neurosci* 25, 9658–9668.

Curcio, M, and Bradke, F (2018). Axon Regeneration in the Central Nervous System: Facing the Challenges from the Inside. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 34, 495–521.

Denny, JB (2006). Molecular Mechanisms, Biological Actions, and Neuropharmacology of the Growth-Associated Protein GAP-43. *Curr Neuropharmacol* 4, 293–304.

Doetsch, F, Caillé, I, Lim, DA, García-Verdugo, JM, and Alvarez-Buylla, A (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703–716.

Enriquez-Barreto, L, Palazzetti, C, Brennaman, LH, Maness, PF, and Fairén, A (2012). Neural cell adhesion molecule, NCAM, regulates thalamocortical axon pathfinding and the organization of the cortical somatosensory representation in mouse. *Front Mol Neurosci* 5.

Eriksson, PS, Perfilieva, E, Björk-Eriksson, T, Alborn, AM, Nordborg, C, Peterson, DA, and Gage, FH (1998). Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313–1317.

Farioli-Vecchioli, S, and Tirone, F (2015). Control of the Cell Cycle in Adult Neurogenesis and its Relation with Physical Exercise. *Brain Plast* 1, 41–54.

Fliegner, KH, Ching, GY, and Liem, RK (1990). The predicted amino acid sequence of alpha-internexin is that of a novel neuronal intermediate filament protein. *EMBO J* 9, 749–755.

Fliegner, KH, Kaplan, MP, Wood, TL, Pintar, JE, and Liem, RKH (1994). Expression of the gene for the neuronal intermediate filament protein α -internexin coincides with the onset of neuronal differentiation in the developing rat nervous system. *Journal of Comparative Neurology* 342, 161–173.

Flynn, KC (2013). The cytoskeleton and neurite initiation. *Bioarchitecture* 3, 86–109.

Frese, CK, Mikhaylova, M, Stucchi, R, Gautier, V, Liu, Q, Mohammed, S, Heck, AJR, Altelaar, AFM, and Hoogenraad, CC (2017). Quantitative Map of Proteome Dynamics during Neuronal Differentiation. *Cell Rep* 18, 1527–1542.

Fuentealba, LC, Obernier, K, and Alvarez-Buylla, A (2012). Adult neural stem cells bridge their niche. *Cell Stem Cell* 10, 698–708.

Fukata, Y, and Fukata, M (2010). Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 11, 161–175.

Fukuyama, K et al. (2000). MAPK upstream kinase (MUK)-binding inhibitory protein, a negative regulator of MUK/dual leucine zipper-bearing kinase/leucine zipper protein kinase. *J Biol Chem* 275, 21247–21254.

Gallo, KA, and Johnson, GL (2002). Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 663–672.

Gdalyahu, A, Ghosh, I, Levy, T, Sapir, T, Sapoznik, S, Fishler, Y, Azoulai, D, and Reiner, O (2004). DCX, a new mediator of the JNK pathway. *The EMBO Journal* 23, 823–832.

Ghosh, AS, Wang, B, Pozniak, CD, Chen, M, Watts, RJ, and Lewcock, JW (2011). DLK induces developmental neuronal degeneration via selective regulation of proapoptotic JNK activity. *The Journal of Cell Biology* 194, 751–764.

Hammarlund, M, Nix, P, Hauth, L, Jorgensen, EM, and Bastiani, M (2009). Axon regeneration requires a conserved MAP kinase pathway. *Science* 323, 802–806.

Hao, Y, Frey, E, Yoon, C, Wong, H, Nestorovski, D, Holzman, LB, Giger, RJ, DiAntonio, A, and Collins, C (2016). An evolutionarily conserved mechanism for cAMP elicited axonal regeneration involves direct activation of the dual leucine zipper kinase DLK. *Elife* 5.

He, Q, Dent, EW, and Meiri, KF (1997). Modulation of Actin Filament Behavior by GAP-43 (Neuromodulin) Is Dependent on the Phosphorylation Status of Serine 41, the Protein Kinase C Site. *J Neurosci* 17, 3515–3524.

Herdegen, T, Claret, F-X, Kallunki, T, Martin-Villalba, A, Winter, C, Hunter, T, and Karin, M (1998). Lasting N-Terminal Phosphorylation of c-Jun and Activation of c-Jun N-Terminal Kinases after Neuronal Injury. *J Neurosci* 18, 5124–5135.

Hergeth, SP, and Schneider, R (2015). The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. *EMBO Rep* 16, 1439–1453.

Hirai, S, Cui, DF, Miyata, T, Ogawa, M, Kiyonari, H, Suda, Y, Aizawa, S, Banba, Y, and Ohno, S (2006). The c-Jun N-terminal kinase activator dual leucine zipper kinase regulates axon growth and neuronal migration in the developing cerebral cortex. *J Neurosci* 26, 11992–12002.

Hirai, S, Kawaguchi, A, Hirasawa, R, Baba, M, Ohnishi, T, and Ohno, S (2002). MAPK-upstream protein kinase (MUK) regulates the radial migration of immature neurons in telencephalon of mouse embryo. *Development* 129, 4483–4495.

Holland, SM, Collura, KM, Ketschek, A, Noma, K, Ferguson, TA, Jin, Y, Gallo, G, and Thomas, GM (2016). Palmitoylation controls DLK localization, interactions and activity to ensure effective axonal injury signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 113, 763–768.

Holzman, LB, Merritt, SE, and Fan, G (1994). Identification, molecular cloning, and characterization of dual leucine zipper bearing kinase. A novel serine/threonine protein kinase that defines a second subfamily of mixed lineage kinases. *J Biol Chem* 269, 30808–30817.

Homma, N, Takei, Y, Tanaka, Y, Nakata, T, Terada, S, Kikkawa, M, Noda, Y, and Hirokawa, N (2003). Kinesin superfamily protein 2A (KIF2A) functions in suppression of collateral branch extension. *Cell* 114, 229–239.

Hsieh, P-C, Chiang, M-L, Chang, J-C, Yan, Y-T, Wang, F-F, and Chou, Y-C (2012). DDA3 stabilizes microtubules and suppresses neurite formation. *J Cell Sci* 125, 3402–3411.

Huntwork-Rodriguez, S, Wang, B, Watkins, T, Ghosh, AS, Pozniak, CD, Bustos, D, Newton, K, Kirkpatrick, DS, and Lewcock, JW (2013). JNK-mediated phosphorylation of DLK suppresses its ubiquitination to promote neuronal apoptosis. *J Cell Biol* 202, 747–763.

Iwasa, JH, and Mullins, RD (2007). Spatial and temporal relationships between actin-filament nucleation, capping, and disassembly. *Curr Biol* 17, 395–406.

Jin, J, Suzuki, H, Hirai, S, Mikoshiba, K, and Ohshima, T (2010). JNK phosphorylates Ser332 of doublecortin and regulates its function in neurite extension and neuronal migration. *Developmental Neurobiology* 70, 929–942.

Kawasaki, A et al. (2018). Growth Cone Phosphoproteomics Reveals that GAP-43 Phosphorylated by JNK Is a Marker of Axon Growth and Regeneration. *IScience* 4, 190–203.

Kawauchi, T (2014). Cdk5 regulates multiple cellular events in neural development, function and disease. *Development, Growth & Differentiation* 56, 335–348.

Kempermann, G, Song, H, and Gage, FH (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a018812.

Kuhn, HG, Dickinson-Anson, H, and Gage, FH (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16, 2027–2033.

Larhammar, M, Huntwork-Rodriguez, S, Rudhard, Y, Sengupta-Ghosh, A, and Lewcock, JW (2017). The Ste20 Family Kinases MAP4K4, MINK1, and TNIK Converge to Regulate Stress-Induced JNK Signaling in Neurons. *J Neurosci* 37, 11074–11084.

Le Pichon, CE et al. (2017). Loss of dual leucine zipper kinase signaling is protective in animal models of neurodegenerative disease. *Sci Transl Med* 9.

Liem, RKH (2016). Cytoskeletal Integrators: The Spectrin Superfamily. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8, a018259.

Liu, G, and Dwyer, T (2014). Microtubule dynamics in axon guidance. *Neurosci Bull* 30, 569–583.

Lledo, P-M, Alonso, M, and Grubb, MS (2006). Adult neurogenesis and functional plasticity in neuronal circuits. *Nat Rev Neurosci* 7, 179–193.

Lowery, LA, and Van Vactor, D (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 332–343.

Luo, L, and O’Leary, DDM (2005). Axon retraction and degeneration in development and disease. *Annu Rev Neurosci* 28, 127–156.

Mahar, M, and Cavalli, V (2018). Intrinsic mechanisms of neuronal axon regeneration. *Nat Rev Neurosci* 19, 323–337.

Malumbres, M (2014). Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol* 15, 122.

Manabe, T, Tatsumi, K, Inoue, M, Matsuyoshi, H, Makinodan, M, Yokoyama, S, and Wanaka, A (2005). L3/Lhx8 is involved in the determination of cholinergic or GABAergic cell fate. *Journal of Neurochemistry* 94, 723–730.

Marcos, S, Moreau, J, Backer, S, Job, D, Andrieux, A, and Bloch-Gallego, E (2009). Tubulin tyrosination is required for the proper organization and pathfinding of the growth cone. *PLoS ONE* 4, e5405.

Mattila, PK, and Lappalainen, P (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 446–454.

Miller, BR, Press, C, Daniels, RW, Sasaki, Y, Milbrandt, J, and DiAntonio, A (2009). A DLK-dependent axon self-destruction program promotes Wallerian degeneration. *Nat Neurosci* 12, 387–389.

Ming, G-L, and Song, H (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687–702.

Mira, H et al. (2010). Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 7, 78–89.

Mirzadeh, Z, Merkle, FT, Soriano-Navarro, M, Garcia-Verdugo, JM, and Alvarez-Buylla, A (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3, 265–278.

Moore, CA, Perderiset, M, Francis, F, Chelly, J, Houdusse, A, and Milligan, RA (2004). Mechanism of Microtubule Stabilization by Doublecortin. *Molecular Cell* 14, 833–839.

Nadeau, A, Grondin, G, and Blouin, R (1997). In Situ Hybridization Analysis of ZPK Gene Expression During Murine Embryogenesis. *J Histochem Cytochem* 45, 107–118.

Nielsen, J, Gotfryd, K, Li, S, Kulahin, N, Soroka, V, Rasmussen, KK, Bock, E, and Berezin, V (2009). Role of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor (GDNF)–Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) Interactions in Induction of Neurite Outgrowth and Identification of a Binding Site for NCAM in the Heel Region of GDNF. *J Neurosci* 29, 11360–11376.

Nihalani, D, Merritt, S, and Holzman, LB (2000). Identification of Structural and Functional Domains in Mixed Lineage Kinase Dual Leucine Zipper-bearing Kinase Required for Complex Formation and Stress-activated Protein Kinase Activation. *J Biol Chem* 275, 7273–7279.

Nihalani, D, Wong, HN, and Holzman, LB (2003). Recruitment of JNK to JIP1 and JNK-dependent JIP1 phosphorylation regulates JNK module dynamics and activation. *J Biol Chem* 278, 28694–28702.

Oliva, AA, Atkins, CM, Copenagle, L, and Banker, GA (2006). Activated c-Jun N-Terminal Kinase Is Required for Axon Formation. *J Neurosci* 26, 9462–9470.

Pallari, H-M, Lindqvist, J, Torvaldson, E, Ferraris, SE, He, T, Sahlgren, C, and Eriksson, JE (2011). Nestin as a regulator of Cdk5 in differentiating myoblasts. *Mol Biol Cell* 22, 1539–1549.

Paton, JA, and Nottebohm, FN (1984). Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 225, 1046–1048.

Picciotto, MR, Higley, MJ, and Mineur, YS (2012). Acetylcholine as a Neuromodulator: Cholinergic Signaling Shapes Nervous System Function and Behavior. *Neuron* 76, 116–129.

Plantman, S, Patarroyo, M, Fried, K, Domogatskaya, A, Tryggvason, K, Hammarberg, H, and Cullheim, S (2008). Integrin-laminin interactions controlling neurite outgrowth from adult DRG neurons in vitro. *Mol Cell Neurosci* 39, 50–62.

Raivich, G et al. (2004). The AP-1 transcription factor c-Jun is required for efficient axonal regeneration. *Neuron* 43, 57–67.

Reddy, UR, and Pleasure, D (1994). Cloning of a novel putative protein kinase having a leucine zipper domain from human brain. *Biochem Biophys Res Commun* 202, 613–620.

Reynolds, BA, and Weiss, S (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707–1710.

Richards, LJ, Kilpatrick, TJ, and Bartlett, PF (1992). De novo generation of neuronal cells from the adult mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 8591–8595.

Russo, A, and DiAntonio, A (2019). Wnd/DLK Is a Critical Target of FMRP Responsible for Neurodevelopmental and Behavior Defects in the Drosophila Model of Fragile X Syndrome. *Cell Reports* 28, 2581–2593.e5.

Rutishauser, U, Acheson, A, Hall, AK, Mann, DM, and Sunshine, J (1988). The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions. *Science* 240, 53–57.

Sahlgren, CM, Mikhailov, A, Vaittinen, S, Pallari, H-M, Kalimo, H, Pant, HC, and Eriksson, JE (2003). Cdk5 regulates the organization of Nestin and its association with p35. *Mol Cell Biol* 23, 5090–5106.

Sainath, R, and Gallo, G (2015). Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. *Cell Tissue Res* 359, 267–278.

Schmid, RS, and Maness, PF (2008). L1 and ncam adhesion molecules as signaling co-receptors in neuronal migration and process outgrowth. *Curr Opin Neurobiol* 18, 245–250.

Shah, K, and Lahiri, DK (2014). Cdk5 activity in the brain – multiple paths of regulation. *J Cell Sci* 127, 2391–2400.

Shin, JE, Cho, Y, Beirowski, B, Milbrandt, J, Cavalli, V, and DiAntonio, A (2012). Dual leucine zipper kinase is required for retrograde injury signaling and axonal regeneration. *Neuron* 74, 1015–1022.

Shin, JE, Ha, H, Kim, YK, Cho, Y, and DiAntonio, A (2019). DLK regulates a distinctive transcriptional regeneration program after peripheral nerve injury. *Neurobiology of Disease* 127, 178–192.

da Silva, JS, and Dotti, CG (2002). Breaking the neuronal sphere: regulation of the actin cytoskeleton in neuritogenesis. *Nat Rev Neurosci* 3, 694–704.

Small, JV, Stradal, T, Vignal, E, and Rottner, K (2002). The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol* 12, 112–120.

Sorrells, SF et al. (2018). Human hippocampal neurogenesis drops sharply in children to undetectable levels in adults. *Nature* 555, 377–381.

Takano, T, Xu, C, Funahashi, Y, Namba, T, and Kaibuchi, K (2015). Neuronal polarization. *Development* 142, 2088–2093.

Tararuk, T et al. (2006). JNK1 phosphorylation of SCG10 determines microtubule dynamics and axodendritic length. *J Cell Biol* 173, 265–277.

Tedeschi, A, and Bradke, F (2013). The DLK signalling pathway--a double-edged sword in neural development and regeneration. *EMBO Rep* 14, 605–614.

Tremblay, RG, Sikorska, M, Sandhu, JK, Lanthier, P, Ribocco-Lutkiewicz, M, and Bani-Yaghoub, M (2010). Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of Neuroscience Methods* 186, 60–67.

Ugarte, F et al. (2015). Progressive Chromatin Condensation and H3K9 Methylation Regulate the Differentiation of Embryonic and Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cell Reports* 5, 728–740.

Vicente-Manzanares, M, Choi, CK, and Horwitz, AR (2009). Integrins in cell migration – the actin connection. *Journal of Cell Science* 122, 199–206.

Welsbie, DS et al. (2013). Functional genomic screening identifies dual leucine zipper kinase as a key mediator of retinal ganglion cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 110, 4045–4050.

Westphal, D, Sytnyk, V, Schachner, M, and Leshchyns'ka, I (2010). Clustering of the Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) at the Neuronal Cell Surface Induces Caspase-8- and -3-dependent Changes of the Spectrin Meshwork Required for NCAM-mediated Neurite Outgrowth. *J Biol Chem* 285, 42046–42057.

Wu, C-C et al. (2015). Akt suppresses DLK for maintaining self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Cell Cycle* 14, 1207–1217.

Yamaguchi, Y, and Miura, M (2015). Programmed cell death in neurodevelopment. *Dev Cell* 32, 478–490.

Yang, M, Wu, M, Xia, P, Wang, C, Yan, P, Gao, Q, Liu, J, Wang, H, Duan, X, and Yang, X (2012). The role of microtubule-associated protein 1B in axonal growth and neuronal migration in the central nervous system. *Neural Regen Res* 7, 842–848.

Yoshida, H, Hastie, CJ, McLauchlan, H, Cohen, P, and Goedert, M (2004). Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by isoforms of c-Jun N-terminal kinase (JNK). *J Neurochem* 90, 352–358.

Yu, W, Qiang, L, Solowska, JM, Karabay, A, Korulu, S, and Baas, PW (2008). The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Mol Biol Cell* 19, 1485–1498.

Yuan, A, Rao, MV, Veeranna, and Nixon, RA (2012). Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci* 125, 3257–3263.

Zhao, C, Deng, W, and Gage, FH (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645–660.

Zhao, J, and Liem, RKH (2016). α -Internexin and Peripherin: Expression, Assembly, Functions, and Roles in Disease. *Meth Enzymol* 568, 477–507.

